

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1927-1928

N° 22

Recherches sur l'Hémolysine
des Pneumocoques.

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le novembre 1928

PAR

Narcisse CHAMBRIN

Ancienne élève de l'Institut Pasteur

JURY

{ MM. RADAIS, *Président.*
LUTZ, *Professeur.*
BACH, *Agrégé.*

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1928

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1927-1928

N° 22

Recherches sur l'Hémolysine des Pneumocoques

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le novembre 1928

PAR

Narcisse CHAMBRIN

Ancienne élève de l'Institut Pasteur

JURY { MM. RADAIS, *Président.*
LUTZ, *Professeur.*
BACH, *Agrégé.*

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

—
1928

Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, *Doyen*, O. ✱, ☉ I.
 PERROT, *Assesseur*, O. ✱, ☉ I.
 G. DURSENT, *Secrétaire*, ✱, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. H. GAUTIER, O. ✱, ☉ I.	Chimie minérale.
RADAIS, O. ✱, ☉ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
BÉHAL, Membre de l'Institut, C. ✱, ☉ I.	Chimie organique.
PERROT, O. ✱, ☉ I.	Histoire naturelle des médicaments.
COUTIÈRE, ✱, ☉ I.	Zoologie.
GRIMBERT, ✱, ☉ I.	Chimie biologique.
LEBEAU, O. ✱, ☉ I.	Pharmacie chimique.
DELÉPINE, O. ✱, ☉ I.	Hydrologie et Hygiène.
GUERBET, ✱, ☉ I.	Toxicologie.
BOUGAULT, ✱, ☉ I.	Chimie analytique.
GORIS, ✱, ☉ I.	Pharmacie galénique.
GUÉRIN, ✱, ☉ I.	Botanique générale.
TASSILLY, ✱, ☉ I.	Physique.

Doyen honoraire : M. H. GAUTIER, O. ✱, ☉ I.

Professeurs honoraires : MM. MOUREU, G. O. ✱, ☉ I. et A. VILLIERS, ✱, ☉ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. DAMIENS, ✱, ☉ I.	Minéralogie.
MARC HONNORAT, ✱, ☉ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LUTZ, ✱, ☉ I.	Cryptogamie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET, ✱, ☉ I.	MM. LAUNOY, ✱, ☉ I.	MM. PICON, ☉ I.
DAMIENS, ✱, ☉ I.	HÉRISSEY, ✱, ☉ I.	MASCRÉ, ☉ I.
LUTZ, ✱, ☉ I.	DELABY, ☉ A.	FABRE ☉ A.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, ✱, ☉ I.	Chimie générale.
COUSIN, ✱, ☉ I.	Chimie analytique.
SOUÈGES, ☉ I.	Micrographie.
LEROUX, ☉ I.	Physique.
DEVAL, ☉ I.	Microbiologie.
HÉRISSEY, ✱, ☉ I. ; DELABY, ☉ A. ;	Agrégés chargés des Travaux généraux de chimie de 4 ^e année.
PICON, ☉ I.	

Bibliothécaire en Chef : M. BEAULIEUX, ☉ I.



A MON PÈRE

A MA MÈRE

A MON FRÈRE

A LA MÉMOIRE DE MES SŒURS

MEIS ET AMICIS

A MES PROFESSEURS DE L'ÉCOLE
DE PLEIN EXERCICE DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE RENNES

A MES MAÎTRES
DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR RADAIS

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris

En témoignage de profond respect.

A MONSIEUR LE DOCTEUR ROUX

Directeur de l'Institut Pasteur

A MONSIEUR LE DOCTEUR M. NICOLLE

Professeur à l'Institut Pasteur

Hommage respectueux.

A MONSIEUR LE DOCTEUR COTONI

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur

Qui nous inspira l'idée de ce travail et qui, par ses conseils éclairés, sa collaboration constante et bienveillante, facilita notre tâche, nous offrons avec nos sincères remerciements, le faible témoignage de notre bien vive reconnaissance.

Recherches sur l'Hémolysine des Pneumocoques

INTRODUCTION

Alors que, depuis 1881, date de la découverte du pneumocoque, les recherches se multiplient nombreuses sur les caractères morphologiques, culturels, antigènes du microbe, l'étude de son pouvoir hémolytique attire peu l'attention des chercheurs. Etant donné la parenté des toxines et des hémolysines, et les notions peu nombreuses que l'on possède sur la toxine du pneumocoque, l'étude de cette hémolysine bactérienne nous a paru mériter d'être reprise.

Si les propriétés hémolytiques du pneumocoque ne sont pas décelables *in vivo*, *in vitro*, au contraire, on est frappé de leur fréquence.

L'hémolysine pneumococcique peut présenter de grandes variations d'intensité selon les échantillons et, pour un même échantillon, selon la composition du milieu et les conditions de la culture. Aussi, pour donner une base solide à nos recherches, les

avons-nous fondées sur l'examen d'une quarantaine de souches, dont le pouvoir hémolytique, étudié à l'isolement, a été étudié de nouveau à des temps divers de leur conservation.

Les échantillons plus anciens de la collection du laboratoire nous ont permis, en outre, de connaître la destinée du pouvoir hémolytique comparée à celle d'autres caractères du pneumocoque tels que solubilité dans les sels biliaires, pouvoir pathogène expérimental. Nous avons ainsi pu constater que toujours la perte de la solubilité dans la bile s'accompagne de la perte du pouvoir hémolytique et de la virulence.

Après avoir étudié l'influence de la composition des milieux sur la production ou la mise en évidence de l'hémolysine nous nous sommes attachée à réunir ses caractères, à rechercher son mode optimum d'action, sa localisation précise dans les cultures, sa résistance à divers agents physiques et chimiques, son action enfin sur les hématies de certaines espèces animales.

Les hémolysines se rapprochant des toxines, nous étions naturellement incitée à immuniser des animaux et nous avons pu conclure que l'hémolysine du pneumocoque est véritablement antigène, engendrant des anticorps qui la neutralisent *in vitro*.

Frappée par le fait du rôle empêchant du sérum normal, nous avons recherché, vis-à-vis de l'hémolysine pneumococcique, l'action de sérums préparés avec des antigènes de nature différente et

avons été amenée à constater le pouvoir fortement inhibiteur de certains sérums antitoxiques.

Enfin, en dernier lieu, nous avons rapproché les caractères de l'hémolysine du pneumocoque de ceux de l'hémolysine du streptocoque, espèce microbienne si voisine, parfois, quant à la morphologie.

HISTORIQUE

Les changements de coloration imprimés aux milieux additionnés de sang, par le développement des streptocoques et des pneumocoques, ont fait l'objet de recherches nombreuses, parmi lesquelles celles de Schottmüller (1903) sont particulièrement connues. On sait que des aspects particuliers aux colonies des streptocoques hémolytiques, des streptocoques « viridans », des germes dénommés « streptotococcus mucosus », des pneumocoques, ont permis à cet auteur une classification et un diagnostic de ces divers types microbiens. Mais l'hémolyse proprement dite due aux pneumocoques est un phénomène assez peu étudié.

Dès 1901, Tizzoni et Panichi (1) signalent le pouvoir hémolytique des pneumocoques.

La même année, Montelli (2) montre à la fois l'existence d'une hémolysine dans les cultures en bouillon et d'une substance antihémolytique dans le sérum des animaux infectés.

1. *Gazz. degli Ospedali*, anno 22, n°s 141, 144, p. 1475, 1508; in Baumgarten's Jahresbericht, 1901, t. 17, p. 40.

2. *Ann d'Igiene sperimentale*, vol. 11, nuova serie, fasc. 4, p. 520; in Baumgarten's Jahresbericht, t. 17, 1901, p. 40:

Casagrandi (1) (1902) rencontre plus souvent le pouvoir hémolytique chez les échantillons les plus pathogènes et établit que le sérum des lapins injectés avec les cultures acquiert des propriétés antihémolytiques.

Pendant longtemps, on ne trouve dans la littérature que des descriptions sommaires et souvent contradictoires relatives à l'aspect des colonies pneumococciques sur la gélose au sang.

Les premiers travaux importants sur l'hémolyse pneumococcique sont dus à Cole (2). En 1912, il confirme l'existence du pouvoir hémolytique chez les pneumocoques. Puis en 1914 (3), il définit plusieurs des propriétés biologiques de l'hémolysine, recherche ses différents modes d'obtention *in vitro* et l'assimile à une vraie toxine endocellulaire provoquant, chez l'animal immunisé contre elle, l'apparition d'une antihémolysine spécifique.

Avery et Mac Neill (4) (1924), au cours de recherches sur les réactions d'oxydation et de réduction dues au pneumocoque, ont été amenés à étudier l'influence de ces réactions sur l'hémolysine et à distinguer différents états de l'hémolysine, selon qu'elle est obtenue à l'air, ou dans le vide.

Mac Neill (5), Fleming et Gaspari (6) (1927) dans

1. *Boll. della Soc. Lancisiana degli Ospedali di Roma*, XXII, II, 1902, in *Biochem. Centr.* I, 1903, p. 200.

2. *J. exp. Med.*, 1912, XVI, p. 644.

3. *J. exp. Med.*, 1914, XX, p. 346.

4. *J. exp. Med.*, 1924, XXXIX, p. 745 ; 1924, XL, p. 423.

5. *J. exp. Med.*, 1927, XLV, p. 105.

6. *J. exp. Med.*, 1927, XLVI, p. 735.

des recherches sur les propriétés immunologiques de certains constituants du pneumocoque, comparent la valeur antigène de l'hémolysine active et de l'hémolysine oxydée.

Nous n'insistons pas davantage sur les résultats des auteurs américains ayant l'occasion d'y revenir à plusieurs reprises au cours de ce travail.

HÉMOLYSE ET HÉMOLYSINE PNEUMOCOCCIQUES

Mise en évidence et titrage.

L'action hémolytique des pneumocoques sur les globules rouges peut être démontrée par plusieurs procédés.

Cole en 1914 (1) a proposé différentes techniques, toutes applicables aux cultures en milieux liquides :

1° *Dissolution par les sels biliaires.* — Des cultures de 20 heures en bouillon sont centrifugées ; le culot de 1 litre, lavé dans l'eau salée à 8,5 ‰ et centrifugé à nouveau, est émulsionné dans 10 cc. d'eau salée puis dissous dans 1 cc. d'une solution de cholate de soude à 2 % et enfin étendu d'eau physiologique jusqu'à 100 cc. : 0 cc. 02 de cette préparation hémolysent 0 cc. 5 d'une émulsion de globules rouges de mouton.

2° *Gel et broyage.* — Un culot de centrifugation d'une culture en bouillon est soumis, après lavage à l'eau physiologique, au gel puis broyé. La poudre ainsi obtenue, suspendue dans l'eau physiologique, donne une préparation de même pouvoir hémolytique que la précédente.

1. *Loc. cit.*

3° *Autolyse*. — Les corps microbiens sont soumis à l'autolyse à 37° dans l'eau salée. Le titre hémolytique est dans ce cas variable suivant le temps de séjour à l'étuve ; maximum entre 6 et 8 heures, faible ensuite, pour être presque nul après 24 heures.

Avery et Mac Neill (1924) (1) utilisent pour l'étude de l'hémolysine trois sortes d'extraits pneumococci-ques préparés à partir de cultures anaérobies en bouillon non glucosé.

1° *Extraits de pneumocoques non lavés*. — Des cultures anaérobies de pneumocoque (type II) sont centrifugées. Le culot, non lavé, est émulsionné dans une petite quantité de bouillon surnageant ou d'une solution de phosphate : 1 cc de cette suspension contient les corps microbiens d'une culture de 35 cc. Sous l'huile de vaseline, dans de longs tubes étroits l'émulsion est soumise au gel et dégel 6 à 9 fois de suite jusqu'à dislocation complète des cellules puis, centrifugée 1 heure à grande vitesse. Le liquide surnageant est à nouveau soumis à 2 autres centrifugations jusqu'à ce qu'il ne donne plus aucun dépôt et enfin filtré sur Berkfeld dans une atmosphère d'azote, afin d'éviter tout contact avec l'oxygène, ces extraits en étant très avides. Les auteurs conservent cette préparation dans de longs tubes étroits sous l'huile de vaseline à la glacière. Cette technique compliquée aboutit à l'obtention d'un liquide très hémolytique mais beaucoup plus altérable à l'air que les liquides obtenus par les procédés suivants.

1. *J. exp. Med.*, 1924, t. XXXIX, p. 357.

2° *Extraits de pneumocoques lavés.* — Les culots microbiens obtenus par centrifugation des cultures liquides sont lavés plusieurs fois dans l'eau ou l'eau physiologique stériles et finalement émulsionnés dans une solution de phosphate n/20 stérile de pH 7.5 ;

3° *Extraits de pneumocoques dissous dans les sels biliaires.* — 15 cc. d'une culture anaérobie en bouillon sont dissous à l'aide de 0 cc. 5 de bile de bœuf stérile dans des tubes étroits que l'on scelle sous l'huile de vaseline et placé 12 heures à 37° ou plusieurs jours à la glacière puis centrifuge.

Avery et Mac Neill réalisent l'hémolyse en employant une suspension à 1 % de globules rouges de lapin, à la dose de 2 cc. 5, à laquelle ils ajoutent, sous un volume fixe de 0 cc. 1, des doses variables d'extrait hémolytique. Le mélange est porté 3 heures à 37° et la lecture finale faite après séjour de 12 heures à la glacière. En somme, ces auteurs utilisent des techniques analogues par leurs principes à celles de Cole, mais attirent l'attention sur la supériorité des extraits de pneumocoques préparés, avec des précautions spéciales, à partir de cultures anaérobies.

La lecture des travaux étrangers ferait parfois penser que la mise en lumière de l'hémolyse pneumococcique nécessite des techniques complexes. Le pouvoir hémolytique est, cependant, facile à déceler à l'aide de techniques très simples, à condition d'employer des milieux additionnés de glucose et dépourvus d'humeurs animales. Ce sont ces mêmes milieux

qui sont utilisés journellement pour l'isolement des pneumocoques et l'étude de leur pouvoir pathogène.

Voici les différentes techniques, que nous avons employées :

1° *Cultures telles quelles.* — Trois milieux s'équivalent pour l'abondance du développement microbien et l'intensité du pouvoir hémolytique. Ce sont ceux que nous avons presque exclusivement adoptés au cours de nos recherches : c'est-à-dire, le milieu T, la macération de panse et le bouillon Martin glucosé ainsi que les milieux précédents à 2 p. 1000.

Le milieu T (1) (milieu de Truche Cramer et Cotoni) est obtenu par dissolution de 40 grammes de peptone Chapoteaut dans 1 litre d'eau distillée, préalablement chauffée au bain-marie vers 80°, et auquel on ajoute 5 grammes de chlorure de sodium et 2 grammes de glucose pur. On alcalinise avec de la lessive de soude jusqu'à réaction légèrement rose à la phénol phtaléine (correspondant à un pH de 7.4 à 7.8). On porte 5' à l'ébullition, filtre, répartit et stérilise 15' à 110°.

La macération de panse glucosée à 2 p. 1000 (préconisée par Salimbeni et d'Ilérelle pour la culture du pneumocoque, et utilisée par M. Nicolle, Jouan et Debains (2) pour le méningocoque), est préparée ainsi : à 1 litre d'eau porté à 55° on ajoute 300 grammes d'estomac de porc haché et 10 cc. d'HCl pur, on

1. *Annales Institut Pasteur*, t. 25, p. 480, 1911.

2. *Annales Institut Pasteur*, 1918, t. 32, p. 150.

maintient à la température de 50°, pendant 7 heures. Quand la digestion est terminée, on porte le liquide à 80° pour détruire la pepsine ; après refroidissement et repos de 2 à 3 jours, on décante la partie claire par siphonnage et alcalinise jusqu'à léger virage au rose de la phénol phtaléine. Après précipitation des phosphates à l'autoclave 15' à 120°, puis filtration, le glucose est ajouté à raison de 2 p. 1000. Le milieu réparti est stérilisé 15' à 110°.

Le Bouillon Martin glucosé à 2 p. 1000 est fait, en mélangeant à parties égales, la solution de peptone alcalinisée, obtenue selon la méthode précédente et une macération de viande (faite à partir de 500 gr. de viande pour 1 litre d'eau). Le tout, après alcalinisation est porté à l'autoclave 15' à 115° pour précipiter les phosphates alcalino-terreux, filtré, puis additionné de 2 grammes de glucose par litre, réparti et enfin stérilisé 15' à 110°.

Qu'il s'agisse de l'un ou l'autre de ces milieux, les cultures ont toujours été faites à l'air à 33° et le pouvoir hémolytique étudié vers la 20^e heure, cet âge du développement microbien étant celui qui correspond, en général, au titre hémolytique le plus élevé.

2^o Corps microbiens émulsionnés dans l'eau physiologique et soumis à l'autolyse. — Le culot microbien d'une culture de 20 heures à 33° dans un des milieux précédents, est lavé puis émulsionné dans un volume d'eau salée à 10 p. 1000. correspondant au volume de la culture originelle. L'émulsion placée à

la glacière y subit un commencement d'autolyse et se montre après 4 à 6 heures aussi hémolytique que la culture dont elle est issue. De plus, le centrifugat d'une telle macération se montre très actif, différence nette avec le liquide clair de culture qui ne présente qu'un titre hémolytique nul ou très affaibli.

Dans ce genre d'extrait comme du reste en culture totale, une certaine autolyse accompagne le passage de l'hémolysine dans le milieu ambiant. Il est utile de remarquer que la température à laquelle on opère a, dans cette préparation, une grande importance : à l'étuve à 37°, l'autolyse est vite réalisée mais l'hémolysine également vite détruite ; à la température du laboratoire, elle résiste davantage ; à la glacière, enfin, l'autolyse est plus lente et l'hémolysine beaucoup plus stable. Alors qu'au bout de 24 heures, cette dernière est à peine affaiblie dans les macérations à la glacière, à la température du laboratoire elle l'est beaucoup plus, et, à 37°, presque toujours détruite.

3° *Corps microbiens traités par l'eau distillée.* — Résultats analogues quand la macération microbienne est faite en eau distillée, du chlorure de sodium étant ajouté au moment de l'hémolyse pour obtenir une concentration finale en NaCl de 10 p. 1.000.

4° *Corps microbiens traités par les sels biliaries.* — Nous utilisons ordinairement pour rechercher la solubilité des pneumocoques dans les sels biliaries (phénomène de Neufeld) un mélange de sels biliaries

dissous au taux de 5 % dans l'eau physiologique, I à III gouttes de cette solution éclaircissent complètement en quelques minutes à la température du laboratoire 1 cc. de culture. L'emploi, dans nos expériences d'hémolyse, de pareilles doses de sels biliaires ajoutées soit à des cultures, soit à des émulsions microbiennes en eau physiologique ne nous a pas donné de résultats supérieurs à ceux des autres procédés. L'emploi des sels biliaires aux doses pour lesquelles la lyse microbienne est totale, semble plutôt gêner que favoriser l'hémolyse. Des doses inférieures ne provoquant pas la dissolution du pneumocoque, tout en favorisant davantage l'hémolyse nous ont fourni des résultats assez inconstants.

5° Corps microbiens traités par le ricinoléate de soude ou l'oléate de soude. — On sait que le ricinoléate est lui-même hémolytique. Nous l'avons employé à des doses incapables à elles seules de dissoudre les hématies telles que VI gouttes d'une solution au 1/1000 dans l'eau distillée pour 1 cc. de culture ou d'émulsion microbienne. Dans ces conditions, après 3/4 d'heure de contact à la température du laboratoire, bien qu'il n'existe pas de lyse microbienne appréciable, — quelques éléments seulement se montrent décolorés par la méthode de Gram — l'hémolyse est nettement favorisée.

L'oléate de soude employé en solution au 1/1000 dans l'eau distillée, incapable à lui seul de dissoudre à ce taux les corps microbiens ou les hématies, fournit des résultats analogues.

6° *Corps microbiens soumis au gel et au dégel.* —

Des culots microbiens, lavés dans l'eau physiologique sont portés alternativement 10 minutes à basse température (-5°) puis 10 minutes à 37° et ainsi 5 à 6 fois de suite. On ajoute alors un volume d'eau physiologique correspondant au volume initial de la culture : le liquide obtenu est hémolytique.

7° *Corps microbiens desséchés.* — Des cultures d'un des 3 milieux cités, âgées de 20 heures sont centrifugées. Le culot microbien, lavé dans l'eau salée, est centrifugé à nouveau, puis desséché dans le vide sulfurique, broyé et conservé au sec. Un centigramme de la poudre microbienne ainsi obtenue mis à macérer dans 10 cc. d'eau physiologique à la glacière pendant 4 ou 6 heures fournit un liquide fortement hémolytique.

Quel que soit le mode de préparation de l'hémolyse, on se sert pour sa recherche et son titrage, des hématies de mouton lavées deux fois et émulsionnées au taux de 10 p. 100 dans l'eau salée à 10 p. 1.000. Dans une série de tubes à hémolyse on répartit, d'après le tableau ci-après, la culture ou le liquide hémolytique en volumes décroissants (XX gouttes à 1 goutte d'une pipette fournissant XX gouttes au cc.). On complète à 1 cc. avec de l'eau physiologique et ajoute dans chaque tube 1 cc. d'émulsion globulaire à 10 p. 100. Le tout est porté au bain-marie à 37° pendant 1 heure; on fait une première lecture à la sortie de l'étuve, puis une deuxième après 12 heures de séjour à la température du laboratoire.

On note alors les différents degrés de l'hémolyse : totale, incomplète ou nulle. *L'unité hémolytique*, c'est-à dire la plus faible quantité d'hémoly-sine capable de *dissoudre complètement* en une heure à 37°, 1 cc. de globules rouges de mouton dilués

Numéros des tubes	Nombre de gouttes de liquide hémolytique	Nombre de gouttes d'eau physiologique	Emulsion à 10 0/0 d'hématies de mouton dans l'eau physiologique (en cc.)
1	XX	O	1
2	XV	V	1
3	X	X	1
4	VIII	XII	1
5	VI	XIV	1
6	IV	XVI	1
7	II	XVIII	1
8	I	XIX	1

à 10 p. 100 dans l'eau physiologique à 10 p. 1000, est contenue dans le dernier tube hémolysé.

L'indice hémolytique est le nombre d'unités hémolytiques contenues dans 1 cc. de liquide hémolytique.

Cette technique nous a paru avantageuse par sa simplicité, sans que nous éprouvions la nécessité de recourir à une méthode colorimétrique.

Notons dès à présent, que dans des conditions différentes, lorsqu'on ajoute du sang stérile au milieu de culture liquide avant l'ensemencement du pneumocoque, on n'observe pas d'hémolyse importante à la suite du développement microbien, mais surtout le brunissement du milieu.

La présence de méthémoglobine toujours observée dans les hémolyses de pneumocoques en cultures totales de 20 heures se manifeste par une teinte feuille morte parfois très accusée. Elle constitue un phénomène beaucoup plus constant encore que celui de l'hémolyse et d'évolution un peu différente. Elle peut être décelée déjà après addition de globules rouges dans des cultures de 7 heures, mais par contre se montre presque toujours absente dans celles de 48 heures, alors que le pouvoir hémolytique peut persister encore.

Des 7 techniques différentes, précédemment indiquées pour la préparation de l'hémolysine, *laquelle est préférable ?*

L'emploi du *gel* et du *dégel* est compliqué et ne paraît pas offrir d'avantages.

L'emploi des *sels biliaires* nous a donné des résultats franchement inférieurs à ceux que donnent les autres techniques.

Le *ricinoléate de soude* nous a permis d'augmenter et parfois même de déceler le pouvoir hémolytique chez certains échantillons peu ou pas actifs, quand ils étaient examinés par les autres procédés.

L'utilisation des *corps microbiens desséchés*, qu'on peut conserver hémolytiques pendant plusieurs années, a pour avantage de permettre des expériences en série avec une provision unique d'un échantillon de pneumocoque d'une teneur constante en hémolysine.

Pour les recherches courantes on a le choix entre

deux procédés : l'emploi des *cultures liquides telles quelles* ou celui des *macérations*. Le premier est très simple, mais la transformation de l'hémoglobine en méthémoglobine s'ajoute à l'hémolyse. Sauf de très rares exceptions tous les échantillons se montrent hémolytiques à l'isolement par ce procédé. Seuls, parmi les pneumocoques isolés depuis plus longtemps de l'organisme, certains demeurent réfractaires. En outre, la fragilité plus grande de l'hémolysine dans les cultures que dans les culots nous amène à considérer l'emploi des macérations microbiennes comme la technique de choix, l'eau *physiologique* restant préférable à l'eau *distillée* pour la simplicité des opérations. Dans ces conditions l'hémolysine est assez stable, on n'observe pas de méthémoglobine et presque tous les échantillons de pneumocoques ainsi traités à l'exception de 4 sur 39 se montrent hémolytiques.

Tout ce qui précède s'applique aux *cultures liquides*.

Sur les *milieux solides*, même enrichis par l'addition de sucres ou de liquides organiques, on sait que le développement du pneumocoque est moins abondant. Cultiver le pneumocoque sur plaques de sang défibriné puis solidifié par la chaleur, ou sur gélose additionnée de globules, semblait tout indiqué pour mettre facilement l'hémolysine en lumière. Les auteurs, cependant, ne tombent pas d'accord sur les résultats obtenus.

Schottmüller (1903) (1) dans son travail classique sur la différenciation des streptocoques et des pneumocoques, emploie un milieu constitué par 5 cc. de gélose et 2 cc. de sang humain. Les pneumocoques ensemencés en surface à 37° fournissent des colonies plates, brillantes, plus volumineuses qu'une tête d'épingle sans halo clair périphérique, à la différence du streptocoque hémolytique. Quand les colonies deviennent confluentes, elles forment une couche vert intense. Cette coloration fait défaut à 22°. Les germes du type *streptococcus mucosus*, identifiés aujourd'hui avec les pneumocoques muqueux du type III, ensemencés en surface à 37°, fournissent des colonies isolées du volume d'une lentille, aplaties et munies d'un centre déprimé. L'aspect de la culture est surtout caractéristique quand les colonies sont confluentes : on observe alors une couche abondante, visqueuse, brillante, gris verdâtre qui devient après 48 heures mate, sèche et foncée. Schottmüller ajoute qu'il n'a pu observer l'hémolyse, qu'après plusieurs jours. A 22°, la coloration verte manque également.

Beitzke et Rosenthal (2) (1905) confirment les expériences de Schottmüller, mais les résultats de divers travaux ultérieurs sont souvent contradictoires.

Rosenow (3) (1904) emploie un milieu constitué

1. *Münch. med. Woch.*, 1903, p. 849 et 909.
2. *Arb. path. Inst. Berlin*, 1906, p. 349.
3. *J. Infect. Dis.*, 1904, I, 280.

par 5 cc. de gélose et 0 cc. 3 à 0 cc. 5 de sang défibriné (homme ou lapin). Les pneumocoques y forment des colonies vertes, entourées d'une zone étroite où les hématies sont détruites, mais cette zone demeuré opaque et verdâtre : jamais elle ne devient claire ni transparente.

Libman (1) (1905) isole du sang d'un pneumonique un échantillon dont les colonies sur gélose-sang sont entourées d'un double cercle hémolytique séparé par un anneau sombre.

Boxer (2) (1906) utilisant de la gélose fondue à parties égales de sang n'a constaté de lyse des hématies par les pneumocoques que dans 5 % des cas (75 % chez les streptocoques observés).

Ruediger (3) (1906) ajoute à de la gélose peptonée non sucrée 0 cc. 3 à 0 cc. 4 de sang défibriné de lapin. Après 24 heures, ou plus, il note autour des colonies vertes quelquefois une hémolyse partielle : les pneumocoques sont ainsi difficilement distingués par lui du streptococque pyogène.

Buerger et Ryttenberg (4) (1907) ne constatent qu'irrégulièrement l'hémolyse en gélose-sang. Thallmann (5) (1910) ensemencant en surface le pneumocoque et le *streptococcus mucosus* sur 10 cc de gélose additionnée de 5 gouttes de sang humain ou animal

1. *Proced. N.-Y. Path. Soc.*, t. V., f. 4-8, 1905, in *Bull.* 1906, p. 455.

2. *Centr. f. Bakt.*, I, Orig., XL, 1906, p. 591.

3. *J. Infect. Dis.*, 1906, III, 663.

4. *J. Infect. Dis.*, 1907, IV, 609.

5. *Centr. f. Bakt.*, I Abt. Orig. 1910, LVI, p. 248.

n'observe pas après 24 heures d'aspect hémolytique.

Bieling (1) (1921), étudiant les moyens de différenciation des streptocoques et des pneumocoques, remarque que parmi ces derniers certains échantillons poussent sur la gélose de Schottmüller en présentant des colonies rappelant celles de streptocoque hémolytique.

Brown (2) (1919) dans sa monographie consacrée à l'emploi de la gélose-sang pour la culture des streptocoques, note que dans son milieu spécial les pneumocoques peuvent comme certains streptocoques présenter des aires hémolytiques.

Hevvit et Famulener (3) placent la gélose-sang, où ont poussé les pneumocoques de différents groupes, à la glacière et observent des zones hémolytiques autour des colonies, analogues à celles qu'on observe avec certains streptocoques dans les mêmes conditions.

En confrontant ces résultats divers, on arrive à conclure que l'aspect des colonies pneumocociques sur la gélose additionnée de sang, et par là même, la mise en lumière de l'hémolyse dépendent étroitement de la composition des milieux, composition variant elle-même avec les auteurs. La même remarque a déjà été faite pour les streptocoques,

1. *Centr. . . Bakt. Orig.*, 1921, Bd. 86, 4, p. 257.

2. *Monograph of the Rockefeller Inst. f. Med. Research*, n° 9, 1919.

3. *Proceed. Exp. Biol. and. Med. N.-Y.*, 1921, XIX, p. 368.

et la monographie de Brown (1) (1919) est consacrée tout entière à l'étude de l'influence des variations de composition des milieux et des conditions de culture sur l'aspect hémolytique ou non, des colonies streptococciques, accessoirement, pneumococciques. D'une façon générale, la gélose au sang constitue un milieu peu propice à l'étude et au titrage du pouvoir hémolytique du pneumocoque.

D'autre part, cultiver en vue de rechercher son pouvoir hémolytique, le pneumocoque sur milieux solides dépourvus de sang, mais enrichis à l'aide de sérosités animales ou de sucres, n'est pas non plus une méthode favorable. Les cultures ne sont jamais très abondantes dans ces conditions et ne donnent après raclage des corps microbiens et macérations dans l'eau physiologique à la glacière qu'une hémolyse faible.

Aussi ne reviendrons nous plus sur l'emploi des milieux solides.

L'HÉMOLYSE « IN VIVO »

In vivo on n'observe pas l'hémolyse pneumococcique. Ni à l'autopsie des animaux, souris, lapins ou cobayes injectés avec des cultures ou morts d'infection spontanée, ni à l'autopsie des pneumoniques, on ne signale de lésions hémolytiques. Rien de compa-

1. *Loc. cit.*

rable à l'aspect laqué du sang, observé après l'inoculation des lapins avec un échantillon de streptocoque franchement virulent, et l'on est frappé de la discordance des résultats obtenus dans les expériences *in vitro* et *in vivo*.

Est-ce à dire qu'aucune trace d'hémolyse ne se réalise *in vivo* ?

Il est possible qu'une lyse ménagée et lente des hématies ne produise aucun changement de coloration du sérum. En fait on est incapable d'affirmer l'existence d'une hémolyse même minime. On peut se demander pourquoi avec les échantillons de pneumocoques les plus divers — fortement hémolytiques *in vitro* — on ne rencontre jamais chez des animaux morts de septicémie de signes d'hémolyse, quoique leur sang puisse au moment de la mort, fourmiller littéralement de bactéries. La question des rapports de l'hémolyse *in vivo* et *in vitro* a déjà été soulevée pour plusieurs espèces bactériennes (Von Wunscheim, 1905) (1). Bien plus, on échoue à produire l'hémoglobininurie ou l'hémoglobininémie en injectant dans la veine du lapin des doses énormes d'hémolysine qui sont capables *in vitro* de dissoudre les hématies de 40 cc. de sang de lapin et qui peuvent d'ailleurs tuer l'animal en quelques heures. Peut-être faut-il incriminer l'action inhibitrice du sérum sur l'hémolyse, action sur laquelle nous aurons l'occasion de revenir.

1. Arch. f. Hygiène, t. 54, 1905, p. 185.

Caractères de l'hémolysine dans
les milieux liquides
Conditions de sa production

Nous ne reviendrons sur l'obtention de l'hémolysine en milieux solides que pour dire que nous l'avons systématiquement écartée. Le faible rendement en corps microbiens dans ces conditions, la plus faible encore intensité du pouvoir hémolytique, l'interprétation du phénomène difficile et son titrage impossible, sont autant de raisons suffisantes pour en négliger l'emploi.

Les *milieux liquides* en définitive ont été seuls adoptés.

Non seulement pour l'obtention de l'hémolysine mais pour le développement du pneumocoque lui-même, la composition des milieux de culture est d'une grande importance : de légères variations dans leurs constituants ou dans leurs réactions entraînant des insuccès fréquents. On connaît l'aptitude du pneumocoque à pousser abondamment dans les milieux usuels : son plus grand développement exige des milieux enrichis d'humeurs animales, ou du moins de glucose ou d'une teneur en peptone suffisante.

Nous étudierons successivement les milieux peptonés glucosés et non glucosés et les milieux additionnés d'humeurs animales en montrant le rôle de leurs différents composants, non seulement sur

la mise en évidence de l'hémolysine, mais encore sur sa production même.

Nous avons signalé plus haut la valeur des milieux glucosés à 20/00 (M.T., macération de panse glucosée, bouillon Martin glucosé), milieux de choix pour déceler l'hémolysine et des plus favorables au développement du pneumocoque.

Quand on supprime le glucose en utilisant par exemple le bouillon Martin simple ou l'eau peptonisée, on sait que les cultures deviennent maigres, parfois misérables. Ces cultures se montrent constamment incapables de fournir l'hémolysine autrement qu'en quantité insignifiante : par exemple un échantillon capable de dissoudre à la dose de 1/10 de cc. en bouillon Martin glucosé, 1 cc. d'émulsion globulaire à 10 p. 100, laisse intacte à la dose de 1 cc. en bouillon Martin simple une même quantité de globules. Cette opposition est-elle explicable par une simple différence dans l'abondance de la récolte ? Il ne le paraît pas. En effet, si on collecte le culot de centrifugation d'un grand volume de culture en bouillon Martin simple, et qu'on l'émulsionne dans un volume d'eau physiologique très réduit, 1/20 cc. par exemple, on obtient une émulsion qui ne manifeste, après macération à la glacière, qu'une hémolyse nulle ou insignifiante.

Le glucose apparaît ainsi comme très favorable à la production de l'hémolysine. Sa présence n'est cependant pas absolument indispensable : si on lui substitue en effet le lévulose, la nouvelle culture

est encore hémolytique. Le saccharose et le lactose employés également à la place du glucose se montrent utiles, eux aussi, à la production de l'hémolysine. A noter cependant une certaine supériorité du glucose sur ces différents sucres en tant que substance particulièrement favorable à la fois au développement microbien et à la formation de l'hémolysine.

Il est une autre classe de milieux dans lesquels le pneumocoque se développe assez abondamment, moins abondamment toutefois que dans les précédents, ce sont ceux enrichis de *sérosités animales* : bouillon ordinaire additionné de sérum équin, de sérum de lapin, à des taux divers (1/10 en général), de liquide d'ascite (1/3).

Les cultures faites dans ces conditions se montrent, *fait curieux*, totalement dénuées de pouvoir hémolytique. Ce dernier manque de façon régulière ; soit qu'on s'adresse aux cultures totales aérobies ou anaérobies, soit même qu'on utilise des culots de centrifugation débarrassés du milieu de culture par deux lavages successifs à l'eau salée et soumis à une macération de plusieurs heures à la glacière, soit encore des culots traités par les sels biliaires ou le ricinoléate de soude.

Il est à remarquer que ces mêmes traitements échouent également à déceler de l'hémolysine, quand on emploie les mêmes milieux sérum additionnés de glucose à 2 p. 1.000. Si donc le glucose semble, d'une part, très favorable pour observer le

pouvoir hémolytique, les sérosités, d'autre part, paraissent exercer un rôle empêchant.

Il y a lieu de préciser maintenant, dans quelles conditions ce rôle empêchant s'exerce : il s'exerce vraisemblablement d'abord *sur la production même de l'hémolysine*.

Partons d'une culture âgée de 20 heures en M.T. sérum, lavons 2 fois dans l'eau salée pour le débarrasser du sérum le culot de centrifugation, puis laissons le macérer dans l'eau salée 4 ou 6 heures à la glacière ; nous échouons à déceler le moindre pouvoir hémolytique dans l'émulsion ainsi obtenue alors qu'une préparation identique faite à partir d'un culot microbien poussé en Milieu T. sans sérum hémolyse à la dose minime de 1 goutte. Il est difficile d'admettre que le culot de centrifugation lavé deux fois contienne une quantité de sérum encore suffisante pour empêcher l'hémolyse. On doit penser que la présence de sérosités dans le milieu de culture empêche, vraisemblablement, *la production d'hémolysine par le Pneumocoque*. Même résultat négatif avec le bouillon Martin glucosé ou la panse glucosée additionnés l'un et l'autre de 1/10 de sérum équin. Il faut abaisser la proportion de sérum à moins de 1 p. 500 si l'on veut ne plus observer de pouvoir empêchant.

Le rôle inhibiteur des humeurs animales, s'exerce également *sur la mise en évidence de l'hémolysine*. Mais ici nous sommes amenée à distinguer l'action

du sérum sur l'hémolysine à sa naissance ou après sa production.

Dans le premier cas (*hémolysine naissante*) faisons l'expérience suivante : Une culture de 16 heures en bouillon Martin glucosé est centrifugée, le culot est lavé dans l'eau physiologique puis émulsionné par moitié dans du bouillon Martin glucosé et dans du bouillon Martin glucosé sérum équin. Après séjour de 24 heures à la glacière : le premier lot seul est hémolytique, aucune hémolyse ne peut être décelée dans le deuxième. Tout se passe donc comme si l'hémolysine était rendue inactive par la présence du sérum animal.

Considérons maintenant l'*hémolysine déjà produite*. Prenons un centrifugat hémolytique, mélangons avec une dose fixe d'hémolysine, des doses diverses de sérum équin normal, portons 1/2 heure à 37° puis ajoutons l'émulsion globulaire et laissons encore 1 heure à 37°. L'hémolyse est totale dans le tube témoin qui contient l'hémolysine seule, elle est le plus souvent simplement partielle, quelquefois nulle, dans les tubes contenant du sérum : c'est affaire de doses et d'échantillons de sérum. Nous voyons ici, la présence de 1/10 de cc. de sérum ne pas empêcher toujours l'hémolyse réalisée par l'Unité hémolytique, alors que cette même dose de 1/10 empêche complètement l'hémolyse en présence d'un culot microbien beaucoup plus riche cependant en hémolysine.

Notons que dans les milieux glucosés additionnés

d'extrait globulaire (Legroux et Agulhon) (1), l'hémolyse n'est ni empêchée, ni favorisée.

Que le pneumocoque soit ensemencé dans les milieux de choix — M. T., panse, B. M. glucosé — *à l'air ou dans le vide*, les différences dans l'intensité de son pouvoir hémolytique ne sont pas très sensibles. Mais ce dernier persiste plus longtemps dans les cultures anaérobies qui s'autolysent aussi plus difficilement. Alors que, en aérobiose, pour un échantillon de pneumocoque donné, le titre hémolytique maximum existe au bout de 20-24 heures à 37° et diminue nettement ensuite, de telle sorte, qu'au bout de 48 heures il est très faible, et qu'à 72 heures en général, complètement absent; en anaérobiose au contraire, l'indice hémolytique encore assez faible à 24 heures, n'atteint son maximum qu'à 48 heures pour ne redescendre que lentement. On peut ainsi constater chez le même échantillon une activité hémolytique encore assez nette au bout de 4 à 5 jours à 37°, et de 10 jours à la glacière. Tel autre pneumocoque, pourtant très autolysable, cultivé à l'air en panse glucosée à 37° n'est plus hémolytique au bout de 48 heures à la dose de 1 cc. de culture, tandis que la culture anaérobie hémolyse encore au bout de 7 jours à la dose de 1/5 de cc.

Dans ces cultures en anaérobiose, différentes précautions de technique sont nécessaires; en effet, comme l'ont constaté Avery et Mac Neill (2), les cul-

1. *Acad. Sc.*, 1918, t. 167, p. 597.

2. *J. exp. Med.*, 1924, XXXIX, p. 745.

tures totales — et surtout anaérobies — de pneumocoques sont très sensibles à l'influence de l'O ; elles subissent des phénomènes d'oxydation très avancés qui vont jusqu'à la formation de H^2O^2 qui, à son tour, détruit rapidement l'hémolysine. Aussi à la sortie de l'anaérobiose, toute la manipulation se fera-t-elle sous une épaisse couche d'huile de vaseline.

Toute une série de recherches ont été poursuivies sur les phénomènes d'oxydation et de réduction dus au pneumocoque. Mac Leod et Govenlock (1) (1921) ont vu qu'il existe dans les cultures de pneumocoques une substance thermolabile, à laquelle ils attribuent l'arrêt du développement. Mac Leod et Gordon (2) (1922-23) ont montré que cette substance est H^2O^2 , opinion confirmée et vérifiée par Avery et Morgan (3) (1924).

Seules les cultures anaérobies, d'après Avery et Mac Neill (4) (1924) ne contiennent pas d'eau oxygénée et n'en renferment qu'après agitation à l'air. Alors que les extraits de pneumocoques préparés par gel et dégel à l'abri de l'air sont très avides d'O qu'ils fixent en produisant H^2O^2 et réduisent fortement le bleu de méthylène ; les extraits, au contraire, préparés par simple suspension des germes dans une solution stérile de phosphate ne fixent l'Oxygène et ne réduisent le bleu de méthylène qu'une fois

1. *Lancet*, 1921, 1, 900.

2. *Biochem. Journ.*, 1922, XVI, p. 499.

3. *J. exp. Med.*, 1924, XXXIX, p. 275-335.

4. *J. exp. Med.*, XXXIX, p. 347; p. 357.

additionnés de bouillon ou d'extrait de levure. Ces auteurs ont recherché ensuite comment se comporte le pouvoir hémolytique au cours de ces réactions d'oxydation. Tandis qu'un extrait gardé à l'abri de l'air sous l'huile de vaseline conserve son pouvoir hémolytique, ce dernier disparaît dans le même extrait exposé à l'air. La stabilité de l'hémolysine diffère aussi notablement suivant qu'on emploie des extraits préparés à l'abri de l'air ou obtenus par simple suspension des corps microbiens dans la solution de phosphate. Dans le premier cas, l'hémolysine disparaît vite après l'exposition à l'air, elle est beaucoup plus stable dans le deuxième cas. En conclusion, l'hémolysine n'est détruite en présence de l'air que dans les extraits capables de s'autoxyder. L'agent de cette destruction serait un peroxyde formé par l'union de l'O moléculaire avec des constituants facilement oxydables de l'extrait.

Tous nos échantillons de pneumocoques, *ont été cultivés à une température de 33° 35°*, cette température a été choisie de préférence à celle de 37° dans le but d'empêcher plus facilement l'autolyse. Dans ces conditions, la plupart des échantillons de pneumocoques fraîchement isolés sont hémolytiques et l'on voit même beaucoup d'échantillons d'isolement ancien le rester encore. On sait que les températures auxquelles se développent les pneumocoques varient dans de larges limites, la composition du milieu intervenant également. C'est ainsi qu'à 24° nous avons réalisé des cultures aussi hémolytiques

qu'à 35°, mais plus tardivement, le développement microbien s'opérant plus lentement.

A quel âge de la culture faut-il rechercher le pouvoir hémolytique ? La réponse varie suivant les échantillons dont la vitesse de développement varie. L'apparition et la durée du pouvoir hémolytique se trouvant ainsi intimement liées, à la fois, à l'abondance et au pouvoir autolysable de la culture. Avant de parler d'âge d'apparition de l'hémolysine il faut bien se mettre d'accord sur l'âge de la culture elle-même. Tout le monde sait les irrégularités dans le départ des cultures : 2 milieux identiques, semencés en même temps, à partir de la même souche, et de la même quantité de semence, ne présentent pas toujours la même abondance dans le même temps. Ce n'est que très exceptionnellement que les cultures de 7 heures en milieux glucosés se montrent hémolytiques, encore le sont-elles faiblement (l'unité hémolytique correspondant à 1 cc. alors que, pour le même échantillon, dans une culture de 20 heures, elle peut être de 1/10 de cc.). Pour constater une aussi faible activité il faut s'adresser à des échantillons facilement autolysables à croissance très rapide.

Doit-on ces insuccès à une culture trop pauvre ou à une inaptitude du pneumocoque à donner à cet âge de l'hémolysine ? Nous avons dans ce but centrifugé une culture très jeune, de 8 heures, d'un échantillon particulièrement hémolytique et émulsionné le culot dans un volume d'eau physiologique

représentant le $\frac{1}{4}$ du volume initial, afin d'obtenir approximativement une densité microbienne sensiblement égale à celle de la culture développée ; or cette émulsion macérée 4 heures à la glacière (temps très suffisant pour avoir avec des culots de 20 heures une hémolysine nette), ne dissout pas les hématies. Au bout de 7 heures de glacière, seulement, on constate une très faible hémolyse. Cette expérience montre, semble-t-il, que, pour qu'un pneumocoque laisse passer dans le milieu ambiant (culture ou eau physiologique) son hémolysine, il faut qu'il soit arrivé à un certain stade de son développement. La composition du milieu de culture ne semble pas avoir d'influence sur l'apparition plus ou moins précoce de l'hémolysine. Le M. T., la panse ou le bouillon Martin glucosés donnent à 33° des cultures dont le pouvoir hémolytique se montre en général maximum entre la 18^e et la 20^e heure. Ce sont les cultures de 20 heures qui fournissent à Cole ses toxines hémolytiques les plus actives. Abandonnés à 33°, certains échantillons, plus réfractaires à l'autolyse que les autres, se montrent encore nettement hémolytiques à 48 heures ; dans quelques cas même le maximum du pouvoir hémolytique est noté à cet âge. Sauf rares exceptions, où nous avons constaté un pouvoir hémolytique encore assez net au bout de 72 heures d'étuve, la plupart des pneumocoques s'en montrent totalement dépourvus.

En définitive, les cultures doivent arriver à un certain stade de leur développement pour se mon-

trer hémolytiques : les cultures jeunes ne le sont pas. Par contre, dans les vieilles cultures où les germes sont devenus Gram-négatifs, l'hémolysine a disparu.

Dans les émulsions microbiennes en eau salée, il en va autrement. A la glacière, elles demeurent hémolytiques pendant plusieurs jours (jusqu'à 7 jours). Nous avons même trouvé chez un échantillon de pneumocoque, une macération encore hémolytique après 20 jours de glacière. A 33°, où l'autolyse s'opère plus rapidement, le pouvoir hémolytique atteint promptement un maximum mais baisse déjà à partir de la 4^e heure et a presque toujours disparu à la 10^e. A la température du laboratoire, on ne peut toujours conserver actives les émulsions pendant 24 heures.

S'il n'est pas possible de changer la nature et la quantité des composants des milieux sans atteindre le pneumocoque dans sa vitalité, on ne peut aussi modifier dans une certaine mesure, la *réaction* du milieu sans apporter des perturbations sensibles dans la vie même du microbe, se répercutant sur son pouvoir hémolytique. Afin d'étudier l'influence de la concentration d'ions hydrogène des milieux de culture sur le pouvoir hémolytique, 3 milieux T de pH différents ont été préparés etensemencés avec un échantillon de pneumocoque particulièrement hémolytique. Le milieu de pH = 7,2, donne au bout de 24 heures une culture très abondante, d'indice hémolytique = 5 mais qui baisse rapidement pour

n'être plus que de 1 à 2 au bout de 48 heures. La culture est alors presque totalement autolysée, et ne présente que quelques rares éléments Gram-positifs. Le milieu de pH = 7,6 possède à 24 heures un indice hémolytique de 2,5 et à 48 heures de 5 à 10 ; la culture n'est que peu autolysée. Enfin le M. T. correspondant au pH de 7,8 donne au bout de 24 heures une culture d'indice hémolytique égal à 4,5 et à 48 h de 10 à 20 : la culture ne possède que de rares éléments Gram-négatifs. La vie du pneumocoque plus courte en milieux faiblement alcalins que dans ceux de pH plus élevé entraîne une autolyse plus rapide qui s'accompagne de la chute du pouvoir hémolytique. L'intensité et surtout la durée du pouvoir hémolytique dans la culture semblent, ainsi, être assez étroitement liées à la réaction du milieu,

Où trouve-t-on l'hémolysine dans les cultures ?

A lire les travaux des auteurs américains ceux-ci ne décèlent pas d'hémolysine dans les cultures telles quelles. Ces dernières pour nous, au contraire, se montrent presque toujours hémolytiques. Des résultats si opposés s'expliquent, sans doute, par l'emploi de milieux non glucosés en Amérique, et glucosés entre nos mains

Dans nos expériences personnelles voici ce que nous observons :

Pour les échantillons de pneumocoques hémolytiques, seuls en cause ici, la culture telle quelle est toujours active. Les corps microbiens isolés par centrifugation le sont également après émulsion et

macération dans l'eau physiologique. Le liquide clair de centrifugation l'est peu ou pas. Chez certains échantillons on observe des cultures telles quelles inactives et des corps microbiens hémolytiques : il s'agit dans ce cas, de pneumocoques peu hémolytiques à l'isolement ou de pouvoir hémolytique affaibli après une conservation prolongée hors de l'organisme.

Quoi qu'il en soit, dans les deux cas on est obligé d'admettre que l'hémolysine est contenue dans les corps microbiens. C'est l'opinion de Cole (1) qui ne fait, en effet, apparaître le principe hémolytique qu'après dissolution ou rupture complètes des éléments bactériens. L'hémolysine est évidemment endocellulaire mais elle diffuse cependant des corps microbiens dans le milieu ambiant (culture ou eau physiologique de macération) avant de se fixer sur les hématies.

Nous avons vu précédemment que les cultures commencent à se montrer hémolytiques seulement à un certain âge du développement pour croître ensuite de façon très sensible jusqu'à un optimum qui est aussi celui de la culture. Pas d'autolyse sensible à ce moment, elle n'apparaît que plus tard, entraînant la chute du pouvoir hémolytique, qui, dès lors, se fait très rapide et totale, bien avant même l'autolyse complète. Tout se passe, semble-t-il, comme si l'hémolysine déchargée dans le

1. *Loc. cit.*

milieu de culture, au fur et à mesure de l'état de maturité du pneumocoque, s'y trouvait instable et facilement détruite par des réactions secondaires du milieu. Comment expliquer autrement les résultats négatifs obtenus avec les liquides clairs de centrifugation de cultures totales hémolytiques ? Non seulement le milieu de culture qui a servi au développement microbien mais encore le milieu neuf, exercent une action inhibitrice sur l'hémolysine ; action due, dans l'un ou l'autre cas, d'après Avery et Mac Neill (1), à des réactions d'oxydation énergiques. Le culot d'une culture glucosée de 20 heures, lavé et réémulsionné dans l'eau physiologique, puis macéré 4 heures à la glacière est franchement hémolytique. L'hémolyse n'est plus que minime, si on remplace l'eau physiologique par du milieu neuf.

Le principe hémolytique devient stable, seulement si les culots microbiens lavés sont émulsionnés dans l'eau physiologique : il ne se fait plus de réactions d'oxydation dans le milieu et l'hémolysine demeure intacte. Bien plus, la macération en eau physiologique donne après centrifugation un liquide presque aussi hémolytique que l'émulsion dont il est issu.

En définitive, malgré l'instabilité de l'hémolysine dans ces conditions, la culture totale se montre toujours nettement hémolytique, en raison de la décharge continuelle d'hémolysine par les corps microbiens qui vient contrebalancer l'effet destructeur

du milieu ; conditions qui n'existent pas dans les liquides clairs de cultures et permettent d'expliquer la faible et souvent nulle activité de ces derniers. Quant aux culots de pneumocoques, débarrassés du milieu par lavages, ils donnent des macérations en eau physiologique et des centrifugats fortement et longtemps hémolytiques.

L'hémolysine pneumococcique est-elle *filtrable* ?

Cole (1914) (1) mentionne brièvement que les solutions biliaires de pneumocoques filtrées sur bougie Berkfeld subissent une diminution plus ou moins marquée, parfois même une perte totale du pouvoir hémolytique. Mac Neill et Avery (2) (1924) filtrant des cultures de pneumocoques des types I, II, III, sur Berkfeld notent des résultats nettement différents s'ils emploient des cultures aérobies ou anaérobies. Dans les deux cas, la filtration étant faite à l'air, le liquide obtenu est dénué de pouvoir hémolytique. Les cultures *anaérobies* au contraire filtrées dans une atmosphère d'azote donnent des filtrats actifs. Nous avons constaté également que les macérations de pneumocoques frais ou secs dans l'eau physiologique, débarrassés ou non des corps microbiens par centrifugation et franchement hémolytiques, perdent, tout comme les cultures totales, leur activité après passage à travers les bougies Chamberland (L₂) ou Berkfeld.

L'influence *de la chaleur* se manifeste diverse-

1. *Loc. cit.*

2. *J. exp. Med.*, 1924, t. 40, p. 423.

ment suivant le milieu qui contient l'hémolysine. Les cultures, telles quelles, se prêtent mal à cette étude à cause de l'action nocive du milieu de culture sur l'hémolysine. Mais si, partant du culot de centrifugation d'une culture liquide, on le laisse macérer 4-6 heures à la glacière dans l'eau physiologique, puis qu'on prélève l'eau salée après centrifugation ou qu'on traite de même des microbes secs, on peut étudier aisément l'influence du chauffage sur l'hémolysine. Nous l'avons vue détruite après chauffage de 10' à 50°, 19 h. à 42°, 24 h. à 35°, affaiblie notablement après 19 h. à 35°, légèrement après 3 h. à 42° résistante enfin après 3 h. à 35°. La température de la glacière la conserve infiniment mieux : dans une de nos expériences la baisse n'était que légère après 25 jours.

Nous avons déjà signalé la remarquable conservation de l'hémolysine dans les corps microbiens pneumococciques *desséchés*.

Par contre, les culots de centrifugation, mis en contact 24 heures avec un mélange à parties égales d'alcool à 95° et d'éther, puis desséchés dans le vide, se montrent totalement ou presque totalement dénués de pouvoir hémolytique : de nombreux échantillons se comportent de cette manière. L'addition aux corps microbiens frais d'alcool absolu, suffit à réduire considérablement le pouvoir hémolytique ; l'addition d'éther ne réussit qu'à l'affaiblir légèrement.

Quant à la *température d'action* de l'hémolysine

sur les globules rouges, elle varie entre certaines limites : de 33° à 40°, l'hémolyse s'opère plus rapidement à mesure que s'élève la température et la différence est particulièrement accusée entre 33° et 37°. A la glacière, la fixation de l'hémolysine a lieu sur les globules rouges, mais l'hémolyse ne se produit pas.

Nous avons étudié l'action de l'hémolysine chez 3 échantillons de pneumocoques, vis-à-vis de 7 espèces d'hématies (homme, lapin, cobaye, bœuf, porc, cheval et mouton). Des doses variables de culture de 20 heures en panse glucosée étaient mises en présence d'un centimètre cube d'émulsion globulaire à 10 p. 100 pendant 1 heure à 35°. Les hématies humaines résistaient à l'action hémolytique d'un des trois échantillons de pneumocoques. Sauf cette particularité, nous n'avons pas observé de différences bien accusées, dans la sensibilité de ces diverses hématies, vis-à-vis de l'hémolysine pneumococcique. Dans certains cas (globules de cobaye) l'hémolyse s'accompagnait d'agglutination.

Pouvoir hémolytique et autres propriétés des pneumocoques.

Nos recherches personnelles ont porté sur 50 échantillons de pneumocoques ; 39 ont été examinés aussitôt après leur isolement de l'organisme (1), 11 avaient été conservés à la glacière

1. La plupart de ces échantillons nous ont été fournis par

depuis plusieurs mois ou plusieurs années dans la gélatine suivant le procédé préconisé par M. Nicolle et Adil-bey pour la conservation du virus de la peste bovine, et employé depuis de longues années par Coton et Truche (4) pour la conservation des pneumocoques. Ce procédé consiste à introduire une partie de la culture à conserver — en M. T. de préférence — dans deux parties de gélatine préalablement fondue. Après agitation pour obtenir un mélange homogène, le tube est scellé, puis gardé à la glacière. La gélatine employée est préparée par dissolution de 150 gr. de gélatine dans un litre d'eau peptonée à 4 p. 100. Après alcalinisation, la préparation est portée 15' à 115°, filtrée, puis répartie en tubes et stérilisée 20' à 110°.

La grande majorité des échantillons provenait d'infections humaines variées (pneumonie, pleurésie, otite, méningite, endocardite, etc...). Une très faible minorité avait pour origine des infections spontanées des animaux (lapin, veau). Nous n'avons retenu pour l'étude en question que des échantillons de diagnostic certain, doués des caractères morphologiques usuels, possédant souvent un certain pouvoir pathogène vis-à-vis de la souris et du lapin et toujours solubles dans les sels biliaires. Les rares pneumocoques insolubles s'étaient montrés solubles lors de leur isolement, cette propriété ayant

MM. Debains et Lévy-Brühl auxquels nous adressons nos plus vifs remerciements.

I. *Ann. Institut Pasteur*, 1912, t. 26, p. 1.

disparu après une conservation prolongée à la glacière. La majorité de nos échantillons étaient agglutinables par un des sérums agglutinants les groupes de pneumocoques I, II et III.

Le pouvoir hémolytique est une *propriété très répandue* parmi les pneumocoques. Sur nos 39 échantillons fraîchement isolés 35 dissolvent les globules rouges, 4 seulement demeurent réfractaires. Dans des recherches anciennes (1911) Truche et Cotonni ayant étudié cette propriété sur 33 échantillons, en trouvaient $\frac{3}{5}$ d'actifs. Plus tard (1919) M. Nicolle et Debains, dans des travaux inédits qu'ils ont bien voulu nous communiquer, déclaraient sur 58 échantillons examinés, le pouvoir hémolytique chez les $\frac{4}{5}$ d'entre eux. Ces deux recherches, faites d'ailleurs avec des techniques un peu différentes des nôtres, établissent également la grande fréquence du pouvoir hémolytique parmi les pneumocoques.

Il ne nous est pas apparu que cette propriété soit plus répandue chez les pneumocoques isolés dans telle variété d'infections.

Si l'on considère les *groupes agglutinants* auxquels appartiennent nos différents échantillons, on trouve que le pouvoir hémolytique, d'intensité variable dans le type I et chez les pneumocoques inagglutinables, est constant et accusé chez les pneumocoques muqueux du type III. Par contre, 2 seuls échantillons appartenant au groupe II ne se sont pas montrés hémolytiques. Nous relevons

Echantillons	Origine	Solubilité dans les sels biliaires (1)	Type	Degré d'hémolyse (le chiffre indique le numéro du dernier tube hémolysé)		Dose mortelle sous la peau de culture liquide exprimée en centimètres cubes ou fraction de centimètre cube
				Culture totale (milieux glucosés à 2 p. 1000)	Emulsion du culot dans l'E. P.	
<i>Echantillons étudiés au moment de leur isole- ment.</i>						
Ott.....	Humaine	+	I	2	2	10-1 = survie
R.....	Humaine (pus pleural)	+	I	3	3	10-4
Achain.....	Humaine (pus d'otite)	+	I	2	2	10-1
Mahaire.....	Humaine (pus méningé)	+	I	2	2	
Debains.....	Humaine (pus pleural)	+	I	5	5	10-3
S ^t Louis.....	Humaine (pus pleural)	+	I	6	6	10-3 au moins
Ort.....	Humaine (pus pleural)	+	I	5	5	10-3 = survie
Gauchet.....	Humaine (pus pleural)	+	I	4	4	10-6 au moins
Meunier.....	Humaine (pus pleural)	+	I	5	5	10-2
Petit.....	Humaine (pus méningé)	+	II	0	0	10-6 au moins
Nett.....	Humaine (pus pleural)	+	II	0	0	10-2 au moins
Marie.....	Humaine (crachat pneum.)	+	III	2	3	10-4 au moins
Nérès.....	Humaine (pus d'otite)	+	III	6	5	10-4 au moins
Marquet.....	Humaine (pus d'otite)	+	III	5	6	20-4 au moins
Convent.....	Humaine (pus d'otite)	+	III	5	6	10-4 au moins
Gasnier.....	Humaine (pus d'otite)	+	III	4	6	
Samson.....	Humaine (pus d'otite)	+	III	6	6	10-6
M.....	Humaine (pus d'otite)	+	III	6	6	10-2 au moins
			III	4	4	10-1

pareillement dans les recherches inédites de M. Nicolle et Debains :

Sur 9 pneumocoques II : 6 non hémolytiques.

Sur 34 pneumocoques inagglutinables : 7 non hémolytiques.

Sur 15 pneumocoques III, tous sont hémolytiques.

Lévy-Bruhl (1) (1928) a également rencontré le pouvoir hémolytique constant chez 20 échantillons du type III.

De ces différentes recherches on pourrait donc conclure à la constance du pouvoir hémolytique chez les pneumocoques I et III, et à sa moindre fréquence chez les pneumocoques II. L'avenir montrera si cette remarque est exacte.

Existe-t-il un rapport entre le pouvoir hémolytique et la *virulence des pneumocoques* pour les animaux ? Le pouvoir hémolytique est une propriété plus répandue que la virulence vis-à-vis du lapin. Si l'on excepte le type II, les échantillons pathogènes pour le lapin sont presque tous franchement hémolytiques ; la réciproque n'est pas toujours vraie ; par contre presque tous nos pneumocoques hémolytiques tuent la souris.

L'intensité du pouvoir hémolytique des germes fraîchement isolés varie largement avec l'échantillon observé. Il y a d'abord ceux — très rares — qui ne produisent aucune hémolysine décelable et ceux

1. *Ann. Inst. Pasteur*, 1928, t. 41, p. 458.

dont l'indice hémolytique peut varier de 0 à 20 : dans ce dernier cas 1 goutte de culture provoque la lyse d'un cent. cube d'émulsion globulaire de mouton à 10 p. 100.

Il est intéressant de connaître la *destinée du pouvoir hémolytique* chez les pneumocoques conservés *in vitro*. On sait que chez certains échantillons gardés à la glacière dans la gélatine suivant le procédé indiqué plus haut, on peut assister à la disparition de certaines propriétés telles que solubilité dans la bile, pouvoir pathogène vis-à-vis du lapin, quelquefois de la souris. Nous avons vu le pouvoir hémolytique demeurer intact au moins un an et en même temps le pouvoir pathogène disparaître vis-à-vis du lapin — mais non de la souris — tandis que les échantillons étudiés demeuraient toujours solubles dans les sels biliaires. Fait observé depuis longtemps par Cotoni, Truche et Mlle Raphaël (1), dans leur étude sur les rapports qui existent entre la solubilité dans la bile et la virulence des pneumocoques.

Chez 11 échantillons conservés depuis de longues années, la plupart à la glacière grâce à des repiquages éloignés mais sans passages par l'animal, 3 jadis solubles et virulents, certains même, connus jadis comme hémolytiques, étaient devenus insolubles, avirulents et non hémolytiques. Sur 8 autres, isolés depuis moins longtemps de l'organisme, 5 étaient demeurés nettement hémolytiques sous la forme de

1. *Ann. Inst. Pasteur*, 1913, t. XXVII, p. 886.

cultures telles quelles (l'un deux pourtant isolé depuis 7 ans), 2 autres échantillons n'hémolysaient que sous forme de macérations en eau salée.

Il est donc certain que la fonction hémolytique peut demeurer fort longtemps chez un pneumocoque conservé exclusivement *in vitro*.

La présence de l'hémolysine dans les culots, son absence dans la culture totale n'impliquent-elles pas une certaine baisse du pouvoir hémolytique ? Une expérience de dégénérescence rapide réalisée sur un échantillon très hémolytique le ferait penser : Nous avons vu une culture de pneumocoque III en panse glucosée abandonnée 12 jours sur la table du laboratoire, un mois après son isolement, fournir une culture-fille qui offrait les caractères suivants : développement beaucoup plus abondant que celui de la culture origine, aspect agglutiné à l'œil nu, très faible solubilité dans la bile, disparition du pouvoir pathogène pour la souris (à la dose de 1/10 de cc.), *disparition du pouvoir hémolytique* à la dose de 1 cc. en culture totale ; le culot seul traité par la ricinoléate de soude hémolysait encore faiblement avant d'aboutir à l'incapacité totale réalisée peu après avec une dégénérescence absolue. L'échantillon origine, conservé correctement, se maintient au contraire depuis lors, soluble, virulent pour la souris et très fortement hémolytique (à la dose de 1/10 cc. de culture).

Il ne nous a pas été possible de faire acquérir à un pneumocoque non hémolytique la faculté de dis-

soudre les globules rouges après *passages par la souris*. Un échantillon de pneumocoque II isolé depuis un mois, non hémolytique, soluble et virulent pour la souris et le lapin, a pu subir 9 *passages* par la souris sans acquérir de propriétés hémolytiques après 28 jours d'expérience.

Si nous essayons, pour terminer, de pénétrer le *phénomène de l'hémolysé*, que se passe-t-il quand l'hémolysine pneumococcique se trouve en contact des globules rouges ? Diffusion totale ou partielle, dans le milieu ambiant, de l'hémoglobine hors des hématies, mais opérée par quel mécanisme ? Encore faut-il pour qu'il y ait diffusion que certaines conditions soient respectées.

Si le contact de l'hémolysine et des globules rouges se fait à 0°, aucune hémolyse ne se produit ; l'hémolysine s'est fixée sur les hématies sans libérer d'hémoglobine : une centrifugation courte et immédiate montre, en effet, un liquide clair totalement incolore, alors que le culot globulaire, émulsionné dans l'eau physiologique, et porté à 37°, laisse diffuser aussitôt son hémoglobine.

Mais, comme Fleming et Neill (1) l'ont prouvé récemment pour l'hémolysine pneumococcique, et avant eux Weinberg et Nasta (2) pour l'hémolysine du Bac. *Perfringens*, la fixation de l'hémolysine sur les globules ne s'opère pas selon des lois simples : la même dose d'hémotoxine qui à 0° se fixe entière-

1. *J. exp. Med.*, 1927, t. XLVI, p. 755.

2. *Ann. Inst. Pasteur*, 1920, t. XXXIV, p. 690.

ment sur une quantité donnée de globules, peut à 37° libérer l'hémoglobine d'une quantité de globules 20 fois plus grande. En d'autres termes : plus d'une molécule d'hémolysine peut se combiner avec une de globules rouges ; ou encore : le nombre de molécules d'hémolysine fixées sur chaque globule est inversement proportionnel à la concentration globulaire, car on admet que l'hémolysine se répartit uniformément sur toutes les hématies. La preuve en est apportée par le fait qu'il y a moins d'hémoglobine diffusée pour une même quantité de globules rouges si ces derniers, au lieu d'être ajoutés en une seule fois à la toxine hémolytique, le sont fractionnellement.

On est ainsi amené à distinguer dans la mesure du phénomène hémolytique : d'une part la *libération de l'hémoglobine* et de l'autre l'*intensité de l'attaque globulaire* : la première n'étant pas forcément proportionnelle à la deuxième.

La sortie de l'hémoglobine n'est en effet qu'un phénomène secondaire dérivé du vrai phénomène de l'hémolyse, lequel intéresse *exclusivement* la paroi des globules rouges (Nolf) (1). Or cette attaque globulaire ne peut se juger que par le phénomène final, c'est-à-dire la libération de l'hémoglobine hors des éléments cellulaires, aussi devons-nous nous soumettre à cette mesure de l'hémoglobine libérée.

Nous avons dit au début de ce travail que nous

1. Dict. Richet, 1909.

adoptions comme Unité de mesure : l'Unité hémolytique déterminée par la dose minimum d'hémolysine capable de dissoudre complètement en une heure à 37° 1 centimètre cube de globules rouges de mouton dilués à 10 %. Aucune cause d'erreur dans cette évaluation ; la concentration globulaire est fixe et la lecture du tube limite franchement hémolysé ne prêtant pas à confusion. Il n'en est plus ainsi si on évalue colorimétriquement l'hémoglobine libérée par des doses d'hémotoxine inférieures à la dose minimum hémolytique : divers facteurs entrant ici en jeu dont on doit tenir compte.

La libération de l'hémoglobine n'obéit pas en effet à des lois simples.

Elle ne sera pas toujours proportionnelle à la concentration en hémolysine. En effet, si pour une concentration globulaire fixe on ajoute des quantités variables de toxine dans un volume final constant, on observe que les très faibles doses ne produisent que peu ou pas d'hémolyse, puis, dans l'étendue d'une zone très large, la quantité d'hémoglobine libérée est proportionnelle à la concentration en toxine ; passé cette zone la première ne croît plus aussi vite que la seconde.

Si, au lieu de faire varier la concentration en hémolysine, on fait varier la concentration globulaire du mélange, on observe que la *libération de l'hémoglobine* dans ce cas est *proportionnelle à la concentration globulaire*. La quantité fixe d'hémolysine adoptée, bien qu'inférieure à la dose minimum

hémolytique, sera cependant capable de libérer plus d'hémoglobine dans les émulsions globulaires concentrées que dans les plus diluées, cela jusqu'à une certaine limite, après laquelle cette proportion ne s'observe plus.

L'hémoglobine libérée est évaluée à l'aide d'une échelle colorimétrique, ce qui permet en outre de constater que sa mesure n'obéit pas à la *loi des multiples*. Si une quantité donnée d'hémolysine libère aux dépens d'un nombre donné de globules, une certaine dose d'hémoglobine les deux facteurs étant multipliés par n on n'obtient pas nécessairement n fois plus d'hémoglobine (c'est affaire de valeur de n).

Sherwood et Downs (1), à propos de l'hémolyse streptococcique se demandent si l'hémoglobine libérée provient de certaines hématies totalement lysées, ou seulement de toutes partiellement, ou enfin à la fois des unes et des autres ? On serait porté à croire qu'il s'agit d'hémoglobine provenant de toutes les hématies (l'hémolysine se répartissant probablement sur toute la masse globulaire comme les expériences précédentes semblent le démontrer), mais à la vérité, la méthode des numérations globulaires ne saurait résoudre toujours le problème.

1. *J. Inf. Dis.*, XXXVI, 1925, p. 547.

ANTIHEMOLYSINE PNEUMOCOCCIQUE.

Les auteurs, peu nombreux, qui ont étudié l'hémolysine pneumococcique, ont été amenés à rechercher l'existence d'une antihémolysine.

Cole (1914) (1) injectant dans les veines du mouton et du lapin des pneumocoques dissous dans le cholate de soude, a obtenu des sérums nettement plus antihémolytiques que les sérums normaux de même espèce : par exemple 2/1000 de cc. de sérum de lapin traité neutralise 2 Unités hémolytiques. Cependant dans aucun cas, Cole n'obtient de sérums 50 fois plus antihémolytiques que les sérums normaux. Les chevaux inoculés avec des microbes vivants dans la veine, fournissent aussi un sérum antihémolytique. Un sérum préparé avec un échantillon de pneumocoque, neutralise non seulement sa propre hémolysine mais encore celles d'autres échantillons.

Mac Neill, Fleming et Gaspari (1927) (2) continuant les recherches d'Avery et de Mac Neill concernant l'effet des réactions d'oxydation et de réduction sur les différents constituants du pneumocoque, étu-

1. *Loc. cit.*

2. *J.exp. Med.*, 1927, XLVI, p. 735.

dient l'influence de ces réactions sur le pouvoir antigène de l'hémolysine. Ils montrent que, rendue inactive par exposition à l'air, l'hémolysine peut retrouver son activité si on la met en présence de bactéries réductrices (coli ou bac. tétanique) et engendrer une antihémolysine, comme le fait l'hémolysine active. Par contre, l'hémolysine oxydée par des agents énergiques ($H^2 O^2$) ne peut être réactivée dans les mêmes conditions et n'est plus antigène.

Avant d'exposer les résultats de nos recherches personnelles sur l'antihémolysine, il est nécessaire de montrer comment on la décèle et la titre dans un sérum. Plusieurs opérations préalables sont nécessaires. Le tout peut être résumé de la façon suivante :

1° Préparation de l'hémolysine. — La plus grande difficulté dans le titrage de l'antihémolysine est de posséder une hémolysine de titre stable. Quand on s'adresse à des cultures telles quelles, on peut observer, d'une heure à l'autre, des variations d'intensité du pouvoir hémolytique. Aussi est-il préférable d'employer des centrifugats d'émulsions microbiennes. On utilise alors des microbes frais ou des microbes secs.

a) *Microbes frais.* — On centrifuge une culture de pneumocoque, âgée de 20 heures, à 33°, en milieu T, panse glucosée ou bouillon Martin glucosé à 2/00. Après décantation du liquide clair, le culot est émulsionné dans l'eau physiologique et

centrifugé à nouveau. Deuxième décantation puis émulsion du culot dans un volume d'eau physiologique égal à celui de la culture originelle. Le mélange est abandonné 4 ou 6 heures à la glacière, et l'on utilise comme hémolysine le liquide clair provenant d'une dernière centrifugation.

b) *Microbes secs*. — 10 mgr. de corps microbiens desséchés sont mis à macérer à la glacière dans 10 cc. d'eau physiologique. Vers la 5ème heure environ, on peut utiliser comme hémolysine, le liquide clair de centrifugation.

L'emploi des microbes secs offre, sur celui des microbes frais, l'avantage d'une plus grande comparabilité entre les expériences.

2° **Titrage de l'hémolysine.** — C'est une des opérations les plus importantes. Sans un titrage précis, pas d'évaluation possible du pouvoir antihémolytique. Il s'agit de déterminer *l'Unité hémolytique* c'est-à-dire la plus faible quantité d'hémolysine capable de dissoudre totalement en 1 heure à 37°, 1 cent. cube d'émulsion d'hématies de mouton à 10 p. 100 dans l'eau physiologique à 10 p. 1000. On verse dans une série de petits tubes stériles 1 cc... 1/20 cc. de centrifugat hémolytique, conservé *dans la glace* pendant la manipulation. Le contenu de chaque tube est complété avec de l'eau physiologique jusqu'au volume de 1 cc. et on ajoute 1 cc. d'émulsion globulaire. Les tubes sont placés 1 heure au bain-marie à 37° puis on lit les résultats.

L'Unité hémolytique adoptée est la quantité d'hémolysine contenue dans le dernier tube où l'hémolyse est totale.

3^e Titrage de l'antihémolysine. — Pendant que les tubes précédents sont à l'étuve, on dilue dans l'eau physiologique le sérum à examiner et on verse dans une série de tubes des quantités de sérum, préalablement chauffé 1/2 heure à 56°, variant de 1/10 cc. à 1/1000 cc. La lecture de l'expérience précédente ayant donné la valeur de l'Unité hémolytique on ajoute alors la quantité d'hémolysine correspondante dans chaque tube et on complète, par addition d'eau physiologique, le volume à 1 cc. On agite et place les tubes 1/2 heure à 37° puis on ajoute l'émulsion globulaire, et abandonne à 37° pendant 1 heure. On ne négligera pas, comme l'indique le tableau ci-joint, de faire un tube témoin, ne contenant que l'Unité hémolytique. Une première lecture est faite après 1 heure à 37°, une deuxième, définitive, le lendemain après séjour des mélanges à la température du laboratoire.

Numéros des tubes	Hémolysine	Anti- hémolysine	Eau physiologique		Emulsion globulaire	
1	1 U. H.	1/10 cc.	Q. S. p. 1 cc.		1 cc.	
2	—	1/50 cc.	—		1 cc.	
3	—	1/100 cc.	—	1/2 h.	1 cc.	1 h.
4	—	1/300 cc.	—	à 37°	1 cc.	à 37°
5	—	1/1.000 cc.	—		1 cc.	
6	—	0	—		1 cc.	

On note pour chaque tube le degré de l'hémolyse : nulle, incomplète ou totale. L'expérience nous a montré qu'il est indiqué de ne retenir pour la détermination du pouvoir antihémolytique que la *dose de sérum empêchant complètement l'hémolyse* : dans le tube correspondant, le culot globulaire intact est surmonté d'un liquide totalement incolore. On pourrait appeler *Unité antihémolytique* la plus petite quantité d'antihémolysine capable d'empêcher complètement dans des conditions expérimentales déterminées, l'hémolyse réalisée par l'Unité hémolytique. *L'indice antihémolytique* deviendrait alors le nombre d'unités antihémolytiques contenues dans 1 cent. cube de sérum.

Il importe de savoir que les *sérums normaux* de différentes espèces animales présentent quelquefois un certain pouvoir antihémolytique. D'après Cole, les sérums normaux de cheval, de mouton, d'homme, de lapin exerceraient un pouvoir empêchant de plus en plus marqué. Il suppose même que ce pouvoir inhibiteur peut être mis sur le compte de la cholestérine qui générerait à doses faibles l'hémolyse ; action déjà constatée chez plusieurs autres hémolysines bactériennes (1).

Sur 34 sérums équins normaux examinés par

1. Signalons que 2 sérums équins normaux d'I. antihémolytique divers (10 et 100), le dernier d'un indice exceptionnellement fort, n'ont pas montré à l'analyse de teneur sensiblement différente en cholestérine. Nous remercions vivement Mme Petit-Dutailis qui a bien voulu faire pour nous cette recherche.

nous, 27 n'empêchaient pas l'hémolyse d'une Unité hémolytique à la dose de $1/10$ cc. Quant aux 7 autres, un seul empêchait l'hémolyse à $1/100$ cc. 2 à $1/50$ cc. 4 à $1/10$ cc. (doses limites).

Sur les sérums de 25 lapins normaux 9 se sont montrés anti à $1/10$ cc. (dose limite).

Obtention de l'antihémolysine

Nous avons étudié la production d'antihémolysine dans le sérum des animaux traités par l'antigène pneumococcique sous différentes formes — le pouvoir antihémolytique dépend, entre autres facteurs notamment, de la forme de l'antigène administré — (microbes vivants et extraits de microbes vivants, microbes secs et extraits de microbes secs, microbes tués par l'alcool-éther). Nous n'avons jamais employé de microbes frais tués par la chaleur. Mac Neill, Fleming et Gaspari (1) qui ont utilisé des émulsions de pneumocoques chauffés les ont trouvées d'ailleurs incapables d'engendrer de l'antihémolysine chez les animaux.

Les sérums étudiés par nous proviennent de 3 origines : sérums de moutons, de lapins, de chevaux (2).

Pour la commodité de l'exposé nous classerons nos différents sérums suivant la forme de l'antigène administré.

1. *J. Exp. Med.*, 1927. XLVI, p. 735.

2. Le sérum d'un pneumonique ne s'est pas montré plus antihémolytique qu'un sérum humain normal.

1^o Microbes vivants et extraits de microbes vivants

a) *Mouton*. — Ce sérum provient d'un animal immunisé par M. Truche il y a fort longtemps en 1911 et 1912. Le mouton était traité par des injections sous-cutanées d'émulsions de pneumocoque dans l'eau physiologique. Le sérum en question a été prélevé après huit mois d'immunisation, à une époque où l'animal avait reçu une quantité de germes correspondant à celle de 1.425 cc. de culture en milieu T. L'échantillon de pneumocoque utilisé comme antigène était hémolytique et a été classé depuis lors dans le groupe III. Le sérum conservé pendant 16 ans sans l'addition d'aucun antiseptique empêche encore totalement l'hémolyse au 1/2000^e cc.

b) *Lapins*. — Les échantillons de pneumocoques employés pour le traitement de tous nos lapins, appartenaient pour la plupart au groupe III ; un seul était inagglutinable par les sérums I, II, III. Les échantillons de pneumocoque III ont été choisis à cause de leur pouvoir hémolytique accusé ; mais la consistance muqueuse de pareils germes et par suite, l'impossibilité d'obtenir un culot bien séparé après centrifugation doit faire préférer l'emploi d'échantillons mieux centrifugeables, appartenant à d'autres groupes.

Quatre animaux ont été traités par des *extraits de*

microbes frais. Les cultures d'un échantillon de pneumocoque III à 35° en panse glucosée étaient centrifugées, le culot lavé à l'eau salée et mis à macérer 5 à 6 heures à la glacière dans un volume d'eau physiologique égal au 1/10 du volume de la culture originelle. Le centrifugat de l'émulsion, hémolytique à 1/20 cc. était utilisé comme antigène.

Quoique l'ensemencement de ce liquide demeurât stérile, 4 cc. injectés dans les muscles et 1 cc. dans la veine ont pu faire périr 2 lapins d'infection pneumococcique — la centrifugation ne réussissant pas à séparer la totalité des corps microbiens. Aussi ce procédé est-il infidèle et peu pratique.

Toutefois nous avons obtenu un sérum antihémolytique au 1/100 cc. chez un lapin qui avait résisté après un mois de traitement à l'inoculation intraveineuse de centrifugats dérivés de la macération des corps microbiens issus de 137 cc. de culture au total.

2° Microbes secs et extraits de microbes secs.

Les corps microbiens, obtenus par centrifugation des cultures liquides étaient desséchés, dans le vide sulfurique, et broyés. La poudre était conservée au sec, en flacons bouchés. Cet antigène a servi à traiter des lapins d'un poids moyen de 2.690 gr. On l'a utilisé sous 2 formes :

a) *Emulsions telles quelles.* — La poudre micro-

bienne était émulsionnée dans l'eau physiologique et injectée aussitôt. 15 lapins ont été ainsi traités.

5 d'entre eux ont reçu l'antigène dans les *veines*. Les injections étaient répétées tous les 8 jours, les 2 premières de 1 cgr., puis les 2 suivantes de 2 cgr. et les saignées d'essai pratiquées tous les 18 jours. Sur ces 5 lapins, 3 sont morts d'infections intercurrentes (pasteurellose), 2 n'ont fourni que des sérums médiocrement antihémolytiques.

Sept lapins ont reçu, 5 dans les *muscles*, 2 sous la *peau*, 10 cgr. de microbes secs à 8 jours d'intervalle. Une première saignée d'essai, faite 10 jours après la deuxième injection, témoignait déjà de l'effet de l'immunisation. Aussitôt après, les injections d'antigène étaient reprises à doses ménagées et légèrement croissantes, en surveillant le poids des animaux. Tous les 18 jours, en général, des saignées d'essai étaient pratiquées et les lapins n'étaient saignés à blanc que quand le titre antihémolytique semblait avoir atteint son maximum. Les 2 lapins inoculés sous la peau ont succombé au cours du traitement. Des 5 lapins injectés dans les muscles, 2 sont morts de pasteurellose après 12 jours et un mois de traitement ; 2 sont morts de cause inconnue (ensemencement du sang du cœur négatif) 25 jours et 4 mois après le début de l'immunisation. Un lapin enfin est mort d'hypersensibilité aussitôt après la 6^e injection.

Enfin une série de 3 lapins, a été immunisée selon le procédé des *injections répétées* : 2, 4, 8 cgr.,

Poids des lapins	Voie	Antigène (forme et type	Dose totale	Durée du traitement	Répartition des doses successives d'antigène	Dates des saignées complètes à partir du début	Indice anti-hémostatique avant le traitement	Indice anti-hémostatique des saignées	Observations
3.170 gr.	veine	sec x (1)	1 cgr.	12 j.	1 cgr.	12 ^e j.	0 (2)	30	mort 12 ^e j. Péricardite purul.
2.340	veine	sec x	2 cgr.	34 j.	1 cgr. les 1 ^{er} , 18 ^e j.	12 ^e j. 34 ^e j.	0	10 10	supprimé le 34 ^e j.
3.420	veine	sec III	4 cgr.	32 j.	1 cgr. les 1 ^{er} , 10 ^e j. 2 cgr., 23 ^e j.	20 ^e j. 32 ^e j.	0	0 10	saigné à blanc, 32 ^e j. amaigrissement.
3.040	veine	sec III	4 cgr.	30 j.	1 cgr. les 1 ^{er} , 10 ^e j. — 2 cgr., 23 ^e j.	10 ^e j.	<10	10	mort pasteurellose.
2.280	veine	sec III	6 cgr.	40 j.	1 cgr. les 1 ^{er} , 10 ^e j. 2 cgr., 23 ^e , 30 ^e j.	20 ^e j. 40 ^e j.	<10	50 100	saigné à blanc, 40 ^e j.
2.280	veine	centrifugat de macération de 7 cgr., 4 sec III	centrifugat de macération de 7 cgr., 4	34 j.	centrifugat de macération de 1 cgr. centrifugat de macér. de 6 cgr., 4, 18 ^e j.	12 ^e j. 27 ^e j.	<10	10 40	supprimé, 34 ^e j.
3.030	peau	sec III	30 cgr.	23 j.	10 cgr. les 1 ^{er} , 8 ^e , 20 ^e j.	18 ^e j.	<10	100	mort 23 ^e j., cause inconnue.
2.650	peau	sec III	40 cgr.	30 j.	10 cgr. les 1 ^{er} , 8 ^e , 20 ^e , 28 ^e j.	18 ^e j.	0	10	mort 30 ^e j. Indigestion.
2.430	muscle	Sec x + III centrifugat de macération de 23 cgr., 6	centrifugat de macér. de 23 cgr., 6	34 j.	centrifugat de mac. de 10 cgr., 1 ^{er} j. — 13 cgr., 6, 18 ^e j.	12 ^e j. 30 ^e j.	10	10	supprimé 34 ^e j.
2.400	muscle	sec x + III	25 cgr.	34 j.	10 cgr. 15 cgr., 18 ^e j.	12 ^e j. 30 ^e j.	10	100 500	saigné à blanc 34 ^e j.
2.370	muscle	sec x + III	20 cgr.	27 j.	10 cgr. les 1 ^{er} , 18 ^e j.	12 ^e j.	<10		mort 27 ^e j. Cult. sang négat.
2.520	muscle	sec III	40 cgr.	34 j.	10 cgr. les 1 ^{er} , 8 ^e , 20 ^e , 28 ^e j.	18 ^e j. 34 ^e j.	0	10 >200 <300	saigné à blanc 34 ^e j. Pasteurellose.
3.480	muscle	sec III	122 cgr.	120 j.	10 cgr. les 1 ^{er} , 8 ^e , 20 ^e , 28 ^e j. 15 cgr., 44 ^e j. 20 cgr., 53 ^e j. — 2 cgr., 74 ^e j.	18 ^e j. 38 ^e j. 63 ^e j.	<10	100 200 1000	

3.030	muscle	sec III	135 cgr.	110 j.	10 cgr. les 1 ^{er} , 8 ^e , 20 ^e , 28 ^e , 41 ^e j. 20 cgr. les 53 ^e , 71 ^e , 100 ^e j. 25 cgr., 108 ^e j.	18 ^e j. 38 ^e j. 63 ^e j. 81 ^e j. 118 ^e j.	10	100 100 200 500 1000	saigné à blanc 120 ^e j.
2.910	muscle	sec III	20 cgr.	12 j.	2 cgr. les 1 ^{er} , 10 ^e j. — 4 cgr. les 2 ^e , 11 ^e j. — 8 cgr., 3 ^e j.		<10		mort 12 ^e j. Pasteurellose.
2.490	muscle	sec III	28 cgr.	12 j.	2 cgr. les 1 ^{er} , 10 ^e j. — 4 cgr., 2 ^e , 11 ^e j. — 8 cgr., 3 ^e et 12 ^e j.	12 ^e j.	<10	100	mort 12 ^e j. Hypersensibilité.
3.400	muscle	sec III	149 cgr.	120 j.	2 cgr. les 1 ^{er} , 40 ^e , 23 ^e , 30 ^e j. 4 cgr., 2 ^e , 11 ^e , 31 ^e j. 8 cgr., 3 ^e , 12 ^e , 32 ^e j. 20 cgr., 48 ^e , 56 ^e , 69 ^e , 99 ^e j. 25 cgr., 107 ^e j.	22 ^e j. 42 ^e j. 66 ^e j. 81 ^e j. 117 ^e j.	<10	100 100 200 500<1000 800<1000	mort 123 ^e j. Cause inconnue.
2.270	muscle	frais III	centrifugat de mac. du culot de 30 cc. de cult.	3 j.	centrifugat de macération des corps microbiens issus de 50 cc. de culture, en 1 fois.		<10		mort 3 ^e j. Infection pneumococcique.
2.480	muscle	frais III	centrifugat de mac. du culot de 50 cc. de cult.	15 j.	centrifugat de macération des corps microbiens issus de 50 cc. de culture, en 1 fois.		<10		mort 15 ^e j. Culture sang négative.
2.350	veine	frais III	centrifugat de mac. du culot de 12 cc. de cult.	8 j.	centrifugat de macération des corps microbiens issus de 12 cc. de culture, en 1 fois.		<10		mort 8 ^e j. Infection pneumococcique.
3.450	veine	frais III	centrifugat de mac. du culot de 137 cc. de cult.	31 j.	centrifugat de macération du culot de 12 cc. de culture. de 25 cc. de culture, 17 ^e j. de 50 cc. de culture, 21 ^e , 24 ^e j.	12 ^e j. 31 ^e j.	<10	10 100	saigné à blanc 31 ^e j.
2.210	muscle	alc. éther x	40 cgr.	39 j.	10 cgr. les 1 ^{er} , 8 ^e , 20 ^e , 28 ^e j.	18 ^e j. 38 ^e j.	<10	<10 10	supprimé le 39 ^e j.
1.850	muscle	alc. éther x	40 cgr.	38 j.	10 cgr. les 1 ^{er} , 8 ^e , 20 ^e , 28 ^e j.	18 ^e j. 38 ^e j.	10	10 10	supprimé le 38 ^e j.
2.820	muscle	alc. éther x	40 cgr.	39 j.	10 cgr. les 1 ^{er} , 8 ^e , 20 ^e , 28 ^e j.	18 ^e j. 38 ^e j.	<10	<10 10	supprimé le 39 ^e j.

1. x signifie : pneumocoque inagglutinable par un des sérums : I, II. 2. 0 signifie : pouvoir antihémostatique nul au 1/40 de cc.

3 jours de suite, dans les *muscles*. Les animaux ont été laissés au repos 8 jours puis ont reçu de nouvelles injections de 2, 4, 8 cgr. et ont été saignés 10 jours après la 6^e injection : puis réinjectés avec 2, 4, 8 cgr. Deux des lapins étant morts à ce moment, l'un d'hypersensibilité, l'autre de pasteurellose, nous avons continué l'immunisation pour le survivant selon le protocole employé pour les animaux des séries précédentes.

Presque tous les lapins qui ont pu être traités longuement, ont présenté des abcès curables au point d'inoculation.

Les meilleurs sérums empêchant à 1/500, 1/1000 cc. l'hémolyse de l'Unité hémolytique, ont été obtenus chez des lapins qui avaient reçu dans les *muscles* des doses de microbes secs variant entre 25 cgr. et 122 cgr., le traitement durant de 43 jours à 4 mois. Les autres sérums possédant un indice antihémolytique de 100 et 200 étaient ceux de lapins injectés indifféremment dans le muscle, la veine ou sous la peau.

b) *Centrifugats de macérations en eau physiologique*. — Les émulsions précédentes étaient abandonnées 24 heures environ à la glacière et on inoculait, dans les muscles ou dans la veine, le liquide clair de centrifugation de même titre hémolytique que l'émulsion.

Deux lapins ayant reçu, l'un dans la veine, l'autre dans le muscle, ce liquide hémolytique, ont bien supporté le traitement, sans que leurs sérums pos-

sèdent un pouvoir anti-hémolytique nettement accusé.

Il faut noter que *tous les lapins* traités suivant des procédés utilisant des voies d'injection et des formes variées d'antigène ont tous fourni des sérums rapidement anti-hémolytiques mais à des taux divers, toujours cependant nettement plus antihémolytiques que les mêmes sérums examinés avant l'immunisation. Mais, en pratique, de ces différents procédés, celui des injections d'émulsions de microbes secs dans les muscles nous paraît préférable : il permet l'administration de fortes doses d'antigène et l'obtention rapide des sérums les plus actifs que nous ayons possédés. Dès la première saignée, c'est-à-dire 18 jours après le début de l'immunisation, on obtient des sérums empêchant l'hémolyse de 1/100, 1/200 de centimètre cube. Le traitement ultérieur des animaux fait monter le titre antihémolytique de façon irrégulière suivant les sujets. Au cours de l'immunisation, ce titre peut baisser puis remonter. Après un certain temps il nous a été impossible d'obtenir des sérums plus actifs. Certains d'entre eux se sont montrés cent fois plus antihémolytiques après qu'avant l'immunisation (V. tableau p. 68-69).

3° Microbes traités par l'alcool-éther.

Les culots de centrifugation de cultures liquides étaient délayés dans un excès d'alcool absolu, on ajoutait partie égale d'éther et laissait reposer pen-

dant 24 heures. Après décantation, le sédiment était desséché dans le vide sulfurique, pulvérisé puis conservé dans des flacons bien bouchés.

a) Trois *lapins*, d'un poids moyen de 2.270 gr., ont reçu dans les muscles, en un mois environ, chacun 40 cgr. de poudre alcool-éther, répartis en 4 injections. Le traitement a été bien supporté; l'amaigrissement léger et passager s'oppose à l'amaigrissement fréquent et parfois intense des animaux traités par les microbes secs, et l'absence de mort aux pertes observées chez ces mêmes animaux. Par contre, les sérums des lapins traités par les pneumocoques alcool-éther n'ont montré qu'un pouvoir antihémitique très faible. On se souviendra d'ailleurs que l'antigène alcool-éther est à peine hémitique.

b) Cette faiblesse du pouvoir antihémitique, se retrouve chez les *chevaux* producteurs de sérums antipneumococciques traités par des injections intraveineuses de corps microbiens tués par l'alcool-éther. Sur 30 sérums équins particulièrement étudiés, un seul empêche l'hémitise aux doses de 1/100 ou de 1/200 suivant les saignées, 3 aux doses de 1/50 à 1/100; 2 à 1/10, les autres n'empêchent pas l'hémitise à 1/10 cc. Ainsi on est surpris de constater que le titre antihémitique de ces sérums ne diffère pas sensiblement, pour la plupart, du titre du sérum équin normal. Nous trouvons là une opposition avec le pouvoir antihémitique accusé des sérums des lapins traités par l'antigène sec. La constatation

est d'autant plus frappante, que ces sérums proviennent de chevaux traités depuis plusieurs années et présentant par ailleurs des propriétés anti-infectieuses décelables chez la souris, précipitantes et agglutinantes. *Un échantillon de sérum peut donc manifester un pouvoir anti-infectieux net chez la souris et n'être nullement antihémolytique.*

A ce propos, ajoutons quelques mots des propriétés comparées de nos divers sérums antipneumococciques. Les différentes propriétés anti-hémolytique, précipitante, agglutinante, anti-infectieuse, ne sont pas *nécessairement associées dans le même échantillon de sérum*. A côté de ces sérums de chevaux peu ou pas anti-hémolytiques mais agglutinants, précipitants, anti-infectieux (titrables chez la souris), préparés avec des pneumocoques alcool-éther; certains sérums de lapins, préparés avec un antigène hémolytique, peuvent se montrer anti hémolytiques et anti-infectieux, protégeant la souris à la dose de $\frac{1}{5}$ cc. la veille sous la peau contre l'inoculation de 1.000 doses mortelles du pneumocoque III correspondant. Par contre, nous avons eu entre les mains un sérum ovin antihémolytique à $\frac{1}{2.000}$ qui cependant ne préservait pas la souris. On observe donc suivant les échantillons de sérum l'existence simultanée ou non du pouvoir anti-infectieux et anti-hémolytique. Quand un échantillon de sérum se montre antihémolytique et même fortement antihémolytique on n'en saurait déduire qu'il protégera la souris. Il est donc impossible de demander à la

recherche du pouvoir anti-hémolytique un renseignement sur le pouvoir anti-infectieux du sérum anti-pneumococcique.

Propriétés de l'antihémolysine pneumococcique et pouvoir antihémolytique.

L'antihémolysine *persiste* dans les sérums chauffés 1/2 heure à 56°. Elle persiste également longtemps dans les sérums conservés : par exemple, deux sérums préparés il y a 16 ans par Truche, chez les moutons, et conservés sans addition d'aucun antiseptique, se montraient encore fortement antihémolytiques. Des sérums préparés par nous chez le lapin ont gardé leur titre antihémolytique intact après 6 mois de conservation à la glacière,

L'antihémolysine contenue dans un sérum anti-pneumococcique donné, *neutralise* l'hémolysine produite par n'importe quel échantillon de pneumocoque, *quelle que soit la race agglutinante de ce dernier*. Par exemple, un sérum préparé à partir d'un échantillon de pneumocoque du type III empêche au même titre l'hémolyse par une hémolysine pneumococcique quelconque. Nos résultats viennent ainsi confirmer ceux de Cole.

L'antihémolysine *se fixe* sur l'hémolysine pour la neutraliser après un temps de contact qui varie avec la température. Nous avons adopté le temps minimum de 1/2 heure à 37° ; à la température ordinaire, la neutralisation est plus lente.

La neutralisation de l'hémolysine par l'antihémolysine pneumococcique, ne suit la *loi des multiples* qu'entre certaines limites. Un certain seuil passé, la quantité d'antihémolysine devient insuffisante pour neutraliser l'hémolysine. Les résultats de l'expérience suivante plaident dans ce sens, comme les recherches de Kraus et Lipschütz (1) (1904) pour les hémolysines du staphylocoque, du bac. tétanique, et du vibrion cholérique. Une unité d'hémolysine pneumococcique étant neutralisée par une unité antihémolytique, 5 le sont par 5, mais pour neutraliser 10 unités hémolytiques, 10 unités antihémolytiques sont insuffisantes et on observe dans ce cas une légère hémolyse.

Nous avons eu la curiosité de voir, si des sérums antipneumococciques, antihémolytiques vis-à-vis de l'hémolysine du pneumocoque, empêchaient aussi l'hémolyse réalisée par des *hémolysines étrangères*. Les recherches ont été faites, vis-à-vis des hémolysines du streptocoque, du bac. tétanique, du vibrion séptique, et du bac. perfringens. Indiquons brièvement le mode de préparation choisi pour chacune d'elles :

1^o *Streptocoque*. — On a utilisé des cultures totales, en bouillon Martin additionné de sérum équin au 1/10, ou en M. T. (2), âgées de 16 heures à 35°. L'unité hémolytique était de 1/10^e de cc, ;

1. Z. f. Hyg., 1904, t. 46, p. 48.

2. Il s'agit naturellement d'un échantillon hémolytique en milieu T, tel n'est pas le cas d'autres échantillons qui n'hémolysent qu'en B. M. sérum. Cf *Ann. I. Pasteur*, 1927, p. 919.

2° *Bac. tétanique*. — On a employé une toxine préparée autrefois par M. Nicolle, Césari et Debains (1) en saturant et précipitant par addition de sulfate de soude anhydre un filtrat de culture de bac. tétanique ; 80 cgr. de la poudre sulfate de soude étaient mis à dialyser dans l'eau distillée 24 heures à la glacière, et on ajoutait au liquide purifié du chlorure de sodium jusqu'à concentration de 1 p. 100.

L'unité hémolytique était de 3/10 cc.

3° *Vibron septique*. — On a employé des cultures anaérobies de 16 heures à 37° dans le bouillon Martin glucosé à 2 p. 1000.

L'unité hémolytique était de 1/5 cc.

4° *Bac. perfringens* — Des cultures anaérobies de même âge, dans le même milieu, ont été centrifugées ; le liquide clair très hémolytique, a été étendu de son volume d'eau physiologique.

L'unité hémolytique du mélange final était 3/20 cc.

Nous avons déterminé le pouvoir antihémolytique des sérums vis-à-vis de ces *différentes hémolysines*, en employant la technique habituelle exposée plus haut. Nos recherches ont été effectuées, comme le montre le tableau ci-joint, sur les sérums de lapins et de mouton antipneumococciques déjà mentionnés. On voit que parmi ces sérums, tous actifs sur l'hémolysine pneumococcique, *aucun ne se montre plus anti vis-à-vis des 4 hémolysines étrangères qu'un sérum normal de même espèce animale*. Il

convient de remarquer que l'hémolyse par l'hémolysine du bacille perfringens peut être gênée par des doses très faibles de sérums même normaux. Weinberg et Nasta (1) ont signalé depuis longtemps ce rôle inhibiteur du sérum équin normal.

On peut donc conclure que nos sérums préparés contre le pneumocoque ont un *pouvoir antihémolytique spécifique*.

Il n'était pas moins intéressant, comme les résultats suivants vont le montrer, d'examiner *vis-à-vis de l'hémolysine du pneumocoque*, l'action d'un *sérum étranger* franchement antihémolytique pour l'hémolysine correspondante.

Certains résultats se dégagent de la lecture de notre tableau.

Plusieurs sérums *antivenimeux* peuvent empêcher, à doses faibles (1/100-1/200 cc.) l'hémolyse pneumococcique.

Même remarque pour un *sérum antitétanique* (1/100 cc.)

Les sérums *antivibrion septique* sont faiblement actifs sur l'hémolysine du pneumocoque ; beaucoup moins que sur l'hémolysine du vibrion septique.

Quant aux 3 échantillons de sérums *antiperfringens*, très actifs vis-à-vis de l'hémolysine du bac. perfringens, 2 d'entre eux ont empêché totalement l'hémolyse par le pneumocoque au 1/100 cc., un troisième presque totalement au 1/500 cc.

Indice antihémolytique
vis-à-vis des hémolysines des microbes suivants :

SÉRUMS	Pneumocoque	Strepto- coque	B. tétanique	Vib. septique	Bac. pérfringens
Anti-pneumococ. { Lapin O6 Lapin J4 Lapin O4 Mouton H	500 500 1.000 2.000	0 0	< 10 50	0 0	Empêchement par- tiel de l'hémolyse entre 1/10 et 1/500 10
Anti-tétanique { Nos 1 2 3 4	10 100 50 10		5.000 5.000 1.000		
Anti-vib. septique { Nos 5 6 7	Pas anti à 1/100 10 Pas anti à 1/100			1.000 50 1.000	
Anti-pérfringens { Nos 8 9 10	100 100 500				10.000 10.000 10.000
Anti-venimeux { Nos 11 12 13 14 15 16	10 50 100 100 200 Pas anti à 1/10				
Mouton normal Lapin normal Cheval normal	10 et < 10 Voir le texte pour le détail des résultats	0 0	100 < 10 10 et 100		10 Emp. partiel à 1/10 500

Certains sérums de chevaux *anti-perfringens* peuvent donc — *résultat inattendu* — *gêner autant et plus, l'hémolyse pneumococcique que certains sérums de lapins antipneumococciques*. Ces sérums perfringens restent cependant inférieurs à notre sérum ovin H. et à celui d'une des saignées d'un lapin hyperimmunisé.

Faut-il mettre sur le compte d'une augmentation de la cholestérine dans le sérum antiperfringens cette action inhibitrice? L'hypothèse nous paraît peu probable, les sérums équin thérapeutiques n'étant pas sensiblement plus riches en cholestérine que les sérums équins normaux (Marie) (1). Ne faut-il pas admettre que les préparations de pneumocoques et de bac. perfringens injectées aux animaux possèdent en commun certains antigènes, d'où la production d'anticorps communs dans les 2 sérums? D'autant que parmi ces sérums « étrangers », anti-hémolytiques vis-à-vis de l'hémolysine pneumococcique, certains précipitent les liquides clairs des cultures pneumococciques. Mais si le sérum antiperfringens est franchement antihémolytique pour le pneumocoque, le sérum antipneumococcique, étudié par nous, n'exerce pas d'action franchement antihémolytique sur l'hémolysine perfringens. Aussi ne pouvons-nous que signaler cette *action curieuse* sans l'expliquer.

Ajoutons que plusieurs échantillons de sérums

1. *Ann. Institut Pasteur*, t. 37, p. 929, 1923.

équins antidiphtérique, antigonococcique, antistreptococcique, antisporogènes, ne se sont pas montrés inhibiteurs vis-à-vis de l'hémolysine du pneumocoque.

Pour terminer nous devons nous demander, quelle est la *nature* de l'hémolysine pneumococcique.

Du fait qu'elle est détruite par la digestion tryptique et engendre des anticorps, Cole (1) croit pouvoir affirmer la nature protéique et non lipode de l'hémolysine. Connell et Holly (2) s'appuyant sur les recherches de Warden qui ont pour objet la composition des microbes, estiment que les constituants gras de ces derniers doivent jouer un rôle dans la production des hémolysines.

Quoi qu'il en soit, par ses propriétés déjà décrites, il est évident que l'hémolysine pneumococcique se rapproche des toxines et des diastases. Rappelons que d'après M. Nicolle et E. Césari (3): « les toxines et enzymes... apparaissent (actuellement) comme des colloïdes protéiques, caractérisés par la nature de leur partie active qui provoque des effets catalytiques soit *in vivo*, soit *in vitro* » ; et qu'« en réalité toxines et enzymes forment une série continue ».

L'hémolysine pneumococcique nous offre en effet, certains caractères des diastases : nature chimique

1. *Loc. cit.*

2. *J. of Bact.*, 1921, t. VI, p. 89.

3. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 36, p. 463.

inconnue, solubilité dans l'eau et les solutions salines diluées, absence de filtrabilité et adhérence aux précipités, instabilité, sensibilité à la chaleur, température optimum d'activité, enfin pouvoir antigène *in vivo*, c'est-à-dire faculté d'engendrer une antihémolysine qui la neutralise.

Mac Neill, Fleming et Gaspari (1) différencient cette hémolysine de la toxine pneumococcique proprement dite, d'ailleurs mal connue, en s'appuyant sur l'expérience suivante : un extrait de pneumocoques, débarrassé de son hémolysine par mise en contact avec des hématies à 0°, demeure capable de tuer le lapin dans les mêmes conditions qu'avant la fixation.

L'hémolysine étant classée dans les diastases, on peut admettre, si l'on s'appuie sur la conception générale de M. Nicolle, qu'elle est composée comme les toxines et les enzymes en général, de deux éléments : « *une partie active* » (ici hémolytique, dans le cas particulier de l'hémolysine), et non antigène ; et un « *bloc inerte* » (non hémolytique) et antigène, c'est-à-dire, capable d'engendrer l'antihémolysine pneumococcique spécifique. La partie active, hémolytique, ne serait pas propre à l'hémolysine pneumococcique, mais commune à toutes les hémolysines bactériennes douées du pouvoir antigène.

1. *J. exp. Med.*, XLVI, 1927, p. 777.

*
* *

Il nous paraît intéressant avant de conclure, d'opposer à l'hémolysine des pneumocoques, celle des streptocoques, espèce microbienne voisine par sa morphologie. L'hémolysine streptococcique (1) est décelée le plus facilement dans les milieux additionnés d'humeurs animales, son existence peut être éphémère dans les cultures, elle est aisément mise en évidence dans les centrifugats des cultures, traverse les bougies filtrantes, produit l'hémolyse *in vivo* et, caractère le plus important, elle s'est montrée jusqu'à ce jour, entre les mains de presque tous les expérimentateurs, incapable d'engendrer une antihémolysine chez les animaux traités.

i. Césari, Cotoni et Lavallo, *Ann. Inst. Pasteur*, 1927, t. XLI, p. 919.

CONCLUSIONS

Le pouvoir hémolytique est une propriété très répandue, et parfois accusée chez les pneumocoques. Seuls, parmi les échantillons de provenance humaine, les pneumocoques du groupe II ne se montrent pas toujours hémolytiques, même à l'isolement de l'organisme. Les milieux de choix pour la production de l'hémolysine sont des milieux riches en peptone et glucosés. Les milieux non glucosés, ou additionnés d'humeurs animales ne conviennent pas. Le maximum du pouvoir hémolytique est décelé, en général, vers la 20^e heure du développement. La stabilité de l'hémolysine, très faible dans le milieu de culture, est relativement grande dans l'eau physiologique. L'hémolysine ne se montre pas filtrable. Elle est sensible à la chaleur, détruite à 50°, en quelques minutes. Par contre, elle se conserve intacte pendant plusieurs années dans le corps microbien desséché. Diverses espèces globulaires sont sensibles *in vitro* à l'hémolysine du pneumocoque. *In vivo*, au contraire, son action ne peut être mise en évidence. Presque tous nos pneumocoques hémolytiques tuent la souris. L'hémolysine, injectée aux animaux, provoque l'apparition d'une antihémoly-

sine rigoureusement spécifique. L'hémolysine pneumococcique peut être gênée dans son jeu par divers sérums normaux, beaucoup plus encore par certains sérums antihémolytiques étrangers (anti-perfringens, anti-venimeux). L'hémolysine du pneumocoque se rattache par ses caractères aux toxines et aux diastases : sa nature, comme celle de tous les antigènes, demeure inconnue.

Vu : le Président de la thèse,

RADAIS.

Vu : le Doyen,

RADAIS.

Vu et permis d'imprimer.

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- Avery et Morgan.* — The occurrence of peroxide in cultures of *Pneumococcus* (J. Exp. Med., 1924, XXXIX, p. 275).
- Avery et Neill (M.).* — Etudies on oxidation and reduction by pneumococcus. I. Production of peroxide by anaerobic cultures of *Pneumococcus* on exposure to air under conditions not permitting active growth (J. Exp. Med., XXXIX, p. 347).
- II. The production of peroxide by sterile extracts of *Pneumococcus* (J. Exp. Med., XXXIX, 1924, p. 357).
 - III. Reduction of methylene Blue by sterile extracts of *Pneumococcus* (J. Exp. Med., XXXIX, p. 543).
 - IV. Oxidation of hemotoxin in sterile extracts of *Pneumococcus* (J. Exp. Med., XXXIX, p. 745).
 - The antigenic properties of solutions of *Pneumococcus* (J. Exp. Med., 1925, XLII, p. 355).
- Beitzke et Rosenthal.* — Arb. path. Inst. Berlin, 1906, p. 349.
- Bieling.* — Centr. f. Bakt. orig., 1921, LXXXVI, p. 257.
- Boxer.* — Centr. f. Bakt. I, orig. XL, 1906, p. 591.
- Buerger et Ryttenberg.* — J. Inf. Dis., 1907, IV, p. 609.
- Brown.* — Monograph, of the Rockefeller Inst. f. Med. Research, n° 9, 1919.
- Casagrandi.* — Boll. della Soc. Laucisiana degli Ospedali di Roma, XXII, II, 1902, in Biochem. Centr., I, 1903, p. 200.
- Césari, Cotoni et Lavallo.* — Recherches sur l'hémolysine streptococcique (Ann. I. P., 1927, t. XLI, p. 919).

Cole (R.). — J. Exp. Med., 1912, XVI, p. 644.

— Pneumococcus hemotoxin (J. Exp. Med., 1914, XX, p. 346).

— The production of methemoglobin by pneumococcus (J. Exp. Med., 1914, XX, p. 363).

Connell et Holly. — The nature of hemolysis (J. of Bact., 1921, VI, p. 89).

Cotoni et Truche. — Etudes sur le pneumocoque. Conservation de la virulence des pneumocoques humains pour la sou-
ris (Ann. I. P., 1912, XXVI, p. 1).

Cotoni, Truche et Raphaël (Mlle). — Etudes sur le pneumocoque. Action de la bile sur les pneumocoques (humains et ani-
maux) (Ann. I. P., 1913, XXVII, p. 886).

— Pneumocoques et affections pneumococciques (Mono-
graph. I. P., 1922).

Fleming et Neill. — The erythrocyte-combining Property of pneumococcus hemotoxin (J. Exp. Med., XLVI, 1927, p. 755).

Guyonnet. — Les hémolysines bactériennes. Thèse pour le doctorat en médecine, Bordeaux, 1919.

Hevitt et Famulener. — Proceed. Exp. Biol. and Med. N.-Y., 1921, XIX, p. 368.

Kraus et Lipschütz. — Ueber Bakterien hämolysine und anti-hämolysine (Zeitsch. f. Hygiène, 1904, t. 46, p. 48).

Libman. — A Pneumococcus producing peculiar form of hemo-
lysis (Proceed N.-Y. Path. Soc., V, 1905, p. 4).

Legroux et Agulhon. — Contribution à l'étude des vitamines utilisables à la culture des micro-organismes (Acad. Sc., 1918, t. 167, p. 597).

Mac Leod et Govenlock. — Lancet, 1921, I, p. 900.

Mac Leod et Gordon. — Biochem. Journ., 1922, XVI, p. 499.

Levy-Bruhl. — Etudes sur le pneumocoque III (Ann. I. P., 1928, T. 41, p. 458).

Marie. — Recherches sur la cholesterinémie (Ann. I.P., t. 37, 1923, p. 929).

Montelli. — Ann. d'Igiene sperimentale, vol. "II, nuova serie fasc. IV, p. 520, in Baumgarten's Jahresbericht, 1901, XVII, p. 40.

Morgan et Avery. — Growth inhibitory substances in Pneumococcus cultures (J. Exp. Med., 1924, XXXIX, p. 335).

Morgan. — The correlation of certain phenomena occurring during the growth of pneumococcus (J. Exp. Med., 1924, XXXIX, p. 565).

Neill et Avery. — Studies on oxidation and reduction by pneumococcus. V. the destruction of oxyhemoglobin by sterile extracts of pneumococcus (J. Exp. Med., XXXIX, 1924, p. 757).

— VI. the oxidation of enzymes in steril extracts of pneumococcus (J. Exp. Med., XL, p. 405, 1924).

— VII. Enzymes activity of sterile filtrates of aerobic and anaerobic cultures of pneumococcus (J. Exp. Med., XL, p. 423).

Neill (J.). — Studies on the oxidation and reduction of immunological substances. I. Pneumococcus hemotoxin (J. Exp. Med., 1926, XLIV, p. 199).

Neill (J.). — II. Production of antihemotoxin by immunization with oxidized pneumococcus hemotoxin (J. Exp. Med., 1927, XLV, p. 105).

Neill (J.), Fleming et Gaspari. — IV. The antigenic properties of hemolytically active and hemolytically inactive modifications of pneumococcus hemotoxin (J. Exp. Med., XLVI, 1927, p. 735).

— Immunological distinctions between the hemotoxin and the « Protein fraction » of the Pneumococcus cell. (J. Exp. Med., XLVI, 1927, p. 777).

Nicolle (M.), Jouan et Debains. — Ann. I. P., 1918, XXXII, p. 150.

Nicolle (M.) et Césari. — Colloïdes, catalyse, antigènes, anti-corps (Ann. I. P., 1922, XXXVI, p. 463).

Nolf. — Dictionnaire Richet, 1909.

Rosenow. — J. Infect. Diseases., 1904, I, p. 280.

Ruediger. — J. Infect. Diseases., 1906, III, p. 663.

Schottmüller. — Münch. Med. Woch., 1903, p. 849 et 909.

Sherwood et Downs. — J. Infect. Dis., XXXVI, 1925, p. 547.

Thalmann. — Central. f. Bakt., orig., 1910, XLVI, p. 248.

Tizzoni et Panichi. — Gazz. degli ospedali, anno 22, n° 141, 144, p. 1475, 1508 in Baumgarten's Jahresbericht, 1901 XVII, p. 40.

Truche, Cramer et Cotoni. — Etudes sur le pneumocoque. Virulence du pneumocoque humain pour la souris (Ann. I. P., XXV, 1911, p. 480).

Von Wunscheim. — Über Hämolyse im Reagenglas und im Tierkörper (Arch. f. Hygiene, t. 54, 1905, p. 185).

Weinberg et Nasta. — Rôle des hémolysines dans l'intoxication microbienne (Ann. I. P., 1920, XXXIV, p. 690).

